



Jorge Alexandre Marmelo Jacob

Licenciado em Ciências de Engenharia Biomédica

Desenvolvimento de placas de microtitulação em papel

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Doutora Elvira Fortunato, FCT/UNL

Co-orientador: Doutor João Inácio, INIAV

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário António Basto Forjaz Secca

Arguente(s): Prof. Doutor Hugo Manuel Brito Águas

Vogal(ais): Prof. Doutora Elvira Maria Correia Fortunato
Doutor João José Inácio



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Fevereiro de 2013



Jorge Alexandre Marmelo Jacob

Licenciado em Ciências de Engenharia Biomédica

Desenvolvimento de placas de microtitulação em papel

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Doutora Elvira Fortunato, FCT/UNL

Co-orientador: Doutor João Inácio, INIAV

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário António Basto Forjaz Secca

Arguente(s): Prof. Doutor Hugo Manuel Brito Águas

Vogal(ais): Prof. Doutora Elvira Maria Correia Fortunato
Doutor João José Inácio



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Fevereiro de 2013

Desenvolvimento de placas de microtitulação em papel

Copyright © 2013 – Todos os direitos reservados. Jorge Alexandre Marmelo Jacob. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



**Este trabalho foi realizado no âmbito do Projeto Lab-on-Paper,
contemplado com Prémio Green Project Awards Portugal 2012
na categoria de Investigação e Desenvolvimento**

Dedicado à memória de:

José Alberto Bagina Jacob (1950 - 2002)

"Obrigado, Pai!"

Agradecimentos

O trabalho de investigação científica é caracterizado por uma enorme dificuldade que é, simultaneamente, o seu grande privilégio. O investigador, sozinho, por mais douto e hábil que seja, pouco consegue fazer. O contributo isolado deste é inócuo para o avanço científico e, principalmente, para o avanço civilizacional que lhe deve ser inerente. O apoio de uma equipa, mais ou menos completa e complexa, são essenciais para que este possa progredir no entanto, o trabalho em equipa nem sempre é fácil e obriga a uma compatibilização não só das competências técnicas, mas também pessoais.

Neste sentido, aos meus orientadores, Professora Elvira Fortunato e Doutor João Inácio., muito obrigada pela transmissão de conhecimentos, disponibilidade e sugestões.

Agradeço também aos companheiros de projeto, David e Mafalda, sem os quais não seria possível concretizar este trabalho. Muito obrigado pela amizade, paciência e ajuda.

Dirijo também um agradecimento muito especial a todo o grupo do CENIMAT por toda a ajuda, apoio e paciência.

A realização de qualquer projeto não é possível sem valores e aptidões pessoais, tais como perseverança, devoção e espírito de equipa. Neste sentido, quero expressar a minha enorme gratidão para com a minha família, em especial à minha mãe Zulmira, e minha irmã Elsa. Obrigado pelo apoio incondicional ao longo de todos estes anos.

Por último e não menos importante, quero expressar a minha gratidão para com todos os meus colegas e amigos. Em especial ao grupo maravilha (David, Manel e Zé), sem o qual não teria chegado a esta fase, ao Fábio pelas horas de tertúlia e orientação (e tecto), ao Rui pela incondicional amizade e desorientamento ocasional e à Joana e Janeca, pela amizade e graaaande paciência. A todos os meus amigos de "intigamente" (Antero, Maurice, Janecas, Zé Manel, Xico, Palma, Nuniinho, e todos aqueles que não menciono) obrigado e aquele abraço que vocês já conhecem.

Resumo

As placas de microtitulação, ou microplacas são uma ferramenta padrão em laboratórios de diagnóstico clínico e investigação analítica. Atualmente possuem medidas padronizadas, usadas em todo o mundo. Como tal, milhares de laboratórios possuem equipamentos, desde robôs para manuseamento das placas, a espectrofotômetros para revelação de resultados, específicos para os formatos padronizados.

Em 2004, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu diretrizes para o desenvolvimento de meios de diagnóstico adequados a países em desenvolvimento e situações de escassez de recursos, sumarizadas pela sigla ASSURED (*Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and robust, Equipment-free and Delivered to those in need*).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma plataforma capaz de complementar ou substituir o uso das microplacas convencionais, com a versatilidade exigida pela OMS. O fabrico das microplacas começa com uma folha de papel de cromatografia, na qual são depositadas barreiras de cera com as medidas exatas das microplacas convencionais. O seu fabrico exige apenas uma impressora comercial de tinta sólida, desenhada para imprimir com uma tinta à base de cera de parafina, e uma placa de aquecimento, para que a cera depositada à superfície do papel se difunda por toda a sua espessura. O trabalho inclui também a validação de um sistema de leitura de resultados de baixo custo, bem como aplicação a testes a diagnóstico de Leishmaniose e Tuberculose.

Abstract

Microtiter plates or microplates are a standard tool in analytical investigation and clinical laboratories. Today the microplates have standard dimensions used worldwide. Thus, thousands of laboratories have all kinds of equipments such as liquid handling systems and automated spectrophotometers (microplate readers), specific to that standard formats.

In 2004 the World Health Organization (WHO) established directives regarding the development of diagnostic technologies suited to developing countries and low resource situations. Those directives are summarized in the acronym ASSURED (Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and robust, Equipment-free and Delivered to those in need).

The main goal of this work is the development of a platform suited to either complement or substitute the conventional microplates, with the versatility demanded by the WHO. The production of the microplates starts by printing a layer of wax in a sheet of chromatography paper. The dimensions of the wax layer are an exact replication of a conventional microplate. The production of these microplates only requires a commercial wax printer, and an hot plate to melt the wax vertically through the paper.

This work also includes the validation of a low cost reading system for assays performed in paper microplates, as well as the application of this platform in diagnostic of canine leishmaniasis and tuberculosis.

Lista de Acrónimos

ADN / DNA - Ácido DesoxirriboNucleico / *DesoxyriboNucleic Acid*

ALP - Enzima fosfatase alcalina

ARN / RNA - Ácido RiboNucleico / *RyboNucleic Acid*

ASSURED - *Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and Robust, Equipment-free and Delivered to those in need*

ATR - *Attenuated Total Reflectance*

AuNP - Nanopartícula de ouro

CENIMAT - Centro de Investigação de Materiais

CIGMH - Centro de Investigação em Genética Molecular Humana

CRT - *Cathode Ray Tube*

CYMB - *Cyan Yellow Magenta Black*

d - Difusão

DAT - *Direct Agglutination Test*

dpi - *Depth per inch*

DSC - *Differential Scanning Calorimetry*

DTA - *Differential Thermal Analysis*

EDS - *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*

ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

FCT-UNL - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

FTIR - *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

HIV - *Human Immunodeficiency Virus*

HTS - *High Throughput Screening*

Ic - Índice de cristalinidade

LFA - *Lateral Flow Assay*

INIAV IP - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

Mtb - *Mycobacterium tuberculosis*

MTBC - *Mycobacterium tuberculosis Complex*

OMS / WHO - Organização Mundial de Saúde / *World Health Organization*

papel B - papel de impressão branco

papel C - papel de filtro de café

papel R - papel de impressão reciclado

papel W - papel de cromatografia Whatman nº1

PBS - *Phosphate buffered saline*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

POCT - *Point Of Care Test*

RGB - *Red Green Blue*

RIA - *Radio ImmunoAssay*

rpoB - Subunidade β da polimerase de RNA

SEM - *Scanning Electron Microscope*

SPR - *Surface Plasmon Ressonance*

TA - *Thermal Analysis*

TB - Tuberculose

TG - TermoGravimetria

TMA - *Thermo Mechanical Analysis*

UV - Ultra Violeta

VL - *Visceral Leishmaniasis*

Lista de Símbolos

€ - Euro
μg - Micrograma
μL - Microlitro
μm - Micrómetro
 A_λ - Absorvância
c - Concentração
cm - Centímetro
E - Energia
keV - kilo Eletrão Volt
kV - kilo Volt
l - Percurso ótico
 L_{barreira} / **Lb** - Largura de uma barreira
 L_{inicial} / **Li** - Largura de uma linha impressa
 L_{nominal} / **Ln** - Largura nominal de uma linha
m - Massa
M - Molar
m² - Metro Quadrado
m³ - Metro cúbico
mg - Miligrama
min - Minutos
mm - Milímetro
mM - Milimolar
mW - MiliWatt
 n_D - Índice de Refração
nm -nanómetro
nmol - Nano mole
°C - Graus celsius
p/v - peso por volume
 P_{barreira} / **Pb** - Diâmetro de uma barreira circular
 P_{inicial} / **Pi** - Diâmetro de um poço impresso
pmol - Pico mole
 P_{nominal} / **Pn** - Diâmetro nominal de um poço
R - Refletância
s - segundo
T - Transmitância
v/v - volume por volume
γ- Tensão superficial
γsl - Energia da interface sólido/líquido
γsl - Tensão superficial do líquido

γ_{sv} - Tensão superficial do sólido

Δp - Diferença de pressão

ϵ_λ - Absortividade

η - Viscosidade

θ - Ângulo de contacto

Índice de matérias

Agradecimentos	VII
Resumo	IX
Abstract	XI
Lista de Acrónimos	XIII
Lista de Símbolos	XV
Índice de matérias	XVII
Índice de Figuras	XIX
Índice de Tabelas	XXIII
1. Introdução	1
1.1 Placas de microtitulação	1
1.1.1 Aplicações e evolução	2
1.1.2 Sistemas periféricos de manuseamento e leitura de resultados	3
1.2 Papel	4
1.2.1 Composição química	4
1.2.2 Propriedades	6
1.3 Microfluídica	6
1.3.1 Microfluídica em papel	6
1.4 Sistema de leitura dos resultados	7
1.5 Aplicações desenvolvidas	8
1.5.1 Diagnóstico de leishmaniose canina: ensaio ELISA	8
1.5.2 Diagnóstico de tuberculose: deteção com nanossondas de ouro	11
2. Técnicas de caracterização	13
2.1 Microscopia eletrónica de varrimento e espectroscopia dispersiva de raios-X	13
2.2 Ângulo de Contacto	14
2.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier	15
2.4 Análise térmica	17
2.4.1 Termogravimetria	17
2.4.2 Calorimetria diferencial de varrimento	18
3. Procedimento e materiais	19
3.1 Preparação dos substratos	19

3.2	Método de produção: impressão a cera	19
3.2.1	Modelos de difusão da cera em papel de cromatografia Whatman Nº1	20
3.2.2	Resolução funcional do método	22
3.3	Formatos desenvolvidos	24
3.4	Sistema de Leitura de Resultados	25
3.4.1	Preparação das soluções	26
3.4.2	Espectrofotometria de absorvância (leitor de microplacas)	27
3.4.3	Medições de refletância (esfera integradora e imagens digitais)	27
3.5	Dispositivos de diagnóstico	28
3.5.1	Procedimento ELISA para diagnóstico de leishmaniose canina	28
3.5.2	Plataforma de papel para detecção de tuberculose com nano partículas de ouro [37]	29
4.	Apresentação e discussão de resultados	31
4.1	Caraterização dos papéis e cera de impressão	31
4.1.1	Microscopia eletrónica de varrimento e espectroscopia dispersiva de raios-X	33
4.1.2	Ângulo de Contacto	40
4.1.3	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier - ATR	42
4.1.4	Análise térmica	44
4.2	Escolha do substrato	47
4.3	Produção das microplacas	48
4.3.1	Tecnologia de impressão	48
4.3.2	Modelos de difusão da cera em papel de cromatografia Whatman Nº1	50
4.3.3	Resolução funcional do método	56
4.4	Sistema de leitura de resultados	60
4.4.1	Espectrofotometria de absorvância (leitor de microplacas)	61
4.4.2	Medições de refletância (esfera integradora e imagens digitais)	63
4.5	Dispositivos de diagnóstico	66
4.5.1	Procedimento ELISA para diagnóstico de leishmaniose canina	66
4.5.2	Plataforma de papel para detecção de tuberculose com nanopartículas de ouro - <i>Gold on paper</i> [37]	69
5.	Conclusões e perspectivas de trabalho futuro	73
	Bibliografia	77
	ANEXOS	81

Índice de Figuras

Figura 1.1 - A) Microplaca transparente de poliestireno com 96 poços [4]; B) Microplaca preta de poliestireno com 384 poços [5].....	2
Figura 1.2 - A) Leitor de microplacas [8]; B) Sistema de deposição de reagentes [9].....	3
Figura 1.3 - Estrutura da celulose e sua organização na parede celular (adaptado de [14]).....	5
Figura 1.4 - Interação de um feixe de luz com uma amostra (adaptado de [25]).....	8
Figura 1.5 - Imagem de microscopia eletrônica de uma <i>Leishmania</i> na forma promastigota, num substrato de vidro (coloração artificial feita em <i>Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated, California, USA)</i>)	9
Figura 1.6 -ELISA indireta e ELISA direta.	11
Figura 1.7 - Ensaio de hibridação <i>non-cross-linking</i> com nanossondas de ouro. O aumento da força iônica provoca a agregação das nanossondas (solução azul), que é impedida pela presença da sequência alvo complementar (adaptado de [44])	12
Figura 2.1 - A) Representação esquemática do SEM (adaptado de [48]); B) Carl Zeiss AURIGA Crossbeam SEM-FIB existente no CENIMAT/I3N	14
Figura 2.2 - A) Esquematização da medição do ângulo de contacto (adaptado de [49]); B) Equipamento OCA 20 da Data Physics.	15
Figura 2.3 - A) Representação do princípio físico do módulo ATR. B) Equipamento Nicolet 6700 FT-IR da Thermo Electron Corporation, presente no CENIMAT/I3N.....	16
Figura 2.4 - A) Comparação de curvas esquemáticas de TG e DSC para uma variedade de processos físicoquímicos [53]; B) Equipamento STA 449 F3 Jupiter da NETZSCH.	17
Figura 3.1 A) Fluxograma do processo de impressão a cera; B) desenho da microplaca; digitalização da microplaca de papel após: C) impressão e D) difusão.....	20
Figura 3.2 - Representação esquemática de uma secção de corte de: A) linha impressa; B) barreira hidrofóbica.	21
Figura 3.3- Representação esquemática de uma secção de corte de: A) poço impresso; B) barreira hidrofóbica	22
Figura 3.4 - Desenho dos esquemas usados para determinar a resolução de: A) barreiras em formato linha e B) poços.	23
Figura 3.5 - Desenho dos padrões usados para determinar: A) o menor canal; B) o menor poço hidrófilo funcional.	24
Figura 3.6 - Desenho técnico de uma microplaca de 96 poços [56]	24
Figura 3.7 - Formatos de microplacas papel com dimensões standardizadas.....	25
Figura 3.8 - Representação do processo de fabrico das microplacas.	25
Figura 3.9 - Suporte usado para medições de absorvância nas microplacas de papel.....	27
Figura 4.1 - A) Papéis testados; B) blocos de cera sólida Xerox.	32
Figura 4.2 - Imagem de SEM de uma amostra de papel W ampliada: A) 100x e B) 1000x.	33
Figura 4.3 - Espectro EDS da amostra de papel W.....	34
Figura 4.4 - Mapas de distribuição dos elementos detetados no papel W.....	34
Figura 4.5 - Imagem de SEM de uma amostra de Papel C ampliada: A) 100x B) e 1000x.....	35

Figura 4.6 - Espectro EDS da amostra de papel C	35
Figura 4.7 - Mapas de distribuição dos elementos detetados no papel C.	36
Figura 4.8 - Imagem de SEM de uma amostra de Papel B ampliada: A) 100x e B) 1000x	36
Figura 4.9 - Espectro EDS da amostra de papel B.	37
Figura 4.10 - Mapas de distribuição dos elementos detetados no papel B.	38
Figura 4.11 - Imagem de SEM de uma amostra de Papel R ampliada 100x e 1000x	38
Figura 4.12 - Espectro EDS da amostra de papel R.	39
Figura 4.13 - Mapas de distribuição dos elementos detetados no papel R.	39
Figura 4.14 - Mapas de distribuição dos elementos detetados na cera de impressão.....	40
Figura 4.15 - Ângulo de contacto das amostras de: A) papel W, B) papel C, C) papel B e D) papel R. .	41
Figura 4.16 - Ângulo de contacto de uma amostra de papel W com cera difundida.....	42
Figura 4.17 - Espectros de infravermelho (ATR) das amostras de papel analisadas.	43
Figura 4.18 - Espectros ATR de cera de impressão e parafina.	44
Figura 4.19 - Curvas TG e DSC de: A) papel Whatman, B) papel de filtro de café, C) papel de impressão branco e D) papel reciclado.....	45
Figura 4.20 - Curvas TG e DSC da cera de impressão	47
Figura 4.21 - Representação dos componentes internos da Impressora Xerox ColorQube 8570.	48
Figura 4.22 - Largura experimental das linhas impressas em função das suas dimensões nominais...	49
Figura 4.23 - Imagem SEM de cera impressa numa folha de papel Whatman (coloração artificial feita em <i>Adobe Photoshop</i>).	50
Figura 4.24 - Representação do efeito da difusão lateral da cera nos dois tipos de padrões usados para estudar este processo.	51
Figura 4.25 - Série de linhas (100 - 700 μm) antes e depois do processo de difusão.	51
Figura 4.26 - Difusão em função da dimensão nominal da linha.	52
Figura 4.27 - Representação gráfica de L_{barreira} em função de L_{nominal} para : A) séries 1 e 2; B) séries 7 e 8.....	53
Figura 4.28 - Série de poços (2 - 20 mm) antes e após o processo de difusão.	54
Figura 4.29 - Difusão em função do diâmetro nominal dos poços.	55
Figura 4.30 - Representação gráfica de P_{barreira} em função de P_{nominal} para : A) séries 1 e 2; B) séries 7 e 8.....	55
Figura 4.31 -Imagens e secções de corte de canais delimitados por linhas e barreiras hidrofóbicas. .	57
Figura 4.32 - Eficácia de isolamento das barreiras em forma de linha em função da sua largura nominal.....	58
Figura 4.33 - Eficácia de isolamento de poços em função das condições de aquecimento	58
Figura 4.34 - Ilustração dos resultados do estudo de avaliação das dimensões nominais do menor canal hidrófilo funcional.....	59
Figura 4.35 - Ilustração dos resultados do estudo de avaliação das dimensões nominais do menor poço hidrófilo funcional.	60
Figura 4.36 - Diluições seriadas de amaranço e azul Comassie em microplaca: A) de plástico e B) de papel.....	60
Figura 4.37 - Espectros de absorvância: A) Das soluções de ambos os corantes e de um poço branco da microplaca de plástico e B) dos corantes e poço branco da microplaca de papel.	61
Figura 4.38 - Curvas de calibração para os corantes azul Comassie e amaranço em placas de papel e plástico. As regressões lineares foram calculadas no Origin 8.5.	62

Figura 4.39 - Espectros de refletância dos dois corantes e de um poço branco da microplaca feita de A) papel de cromatografia Whatman Nº1 e B) papel de filtro de café.	63
Figura 4.40 - Análise RGB das diluições dos corantes A) amaranth e B) azul Comassie.	64
Figura 4.41 - Curvas de calibração de amaranth red e comassie blue para imagens capturadas por um scanner e por uma máquina fotográfica.	65
Figura 4.42 - Ilustração de um ensaio ELISA para detecção de anticorpos anti-leishmania (resultado positivo).	67
Figura 4.43 - A) resultados dos ensaios para soros positivo e negativo e solução de controlo; B) análise de intensidade da cor por cada zona de teste. A análise estatística foi feita em Prism 5 Graph Pad, por meio de uma análise de variância (ANOVA) com teste de Tukey para comparação de médias; *** = $p < 0,0001$; $n = 5$	68
Figura 4.44 - Ilustração de um ensaio da plataforma Gold on paper (síntese das nanossondas, preparação e execução do ensaio em papel).	69
Figura 4.45 - Resultados do ensaio colorimétrico realizado em papel (A) e correspondentes análises RGB no software Image J (C) e na aplicação ColorPikr (D). O ensaio foi realizado paralelamente em solução e analisado num leitor de microplacas convencional (B). Análise de variância feita em Prism 5 Graph Pad com teste de Tukey para comparação de médias; *** = $p < 0,0001$, $n = 3$. Adaptado de [37].	70
Figura 4.46 - Imagens SEM dos resultados da plataforma Gold on paper (coloração artificial em Adobe Photoshop).	71
Figura 4.47 - Mapas de distribuição dos elementos de um poço da plataforma <i>Gold on paper</i> com um resultado negativo (nanossondas agregadas).	72

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Tipos de revestimento de microplacas [6].	3
Tabela 1.2 - Quantidade relativa de celulose, hemicelulose, pectina e lenhina na constituição de fibras de plantas [15].	5
Tabela 3.1 - Temperaturas e tempos de aquecimento de cada série	21
Tabela 3.2 -Quantidades de corante e concentração das soluções depositadas em microplaca de papel e plástico.....	26
Tabela 4.1 - Propriedades macroscópicas dos papéis testados (adaptado de [64])	32
Tabela 4.2 - Equações das retas de ajuste entre os parâmetros L_{barreira} (y) e L_{nominal} (x).	53
Tabela 4.3 - Equações das retas de ajuste entre os parâmetros P_{barreira} (y) e P_{nominal} (x).....	56

Capítulo 1

Introdução

O trabalho descreve o desenvolvimento de placas de microtitulação em papel, como alternativa às microplacas convencionais moldadas a partir de polímeros. Deste modo é apresentada uma pesquisa acerca destas ferramentas e da instrumentação paralela que lhe está associada. Uma vez que os dispositivos são feitos em papel, é feita uma descrição acerca da sua composição química e propriedades de interesse para o trabalho. O fabrico dos sensores explora a tecnologia emergente da microfluídica em papel, pelo que é feita uma breve descrição da tecnologia, bem como dos princípios físicos inerentes. É feita uma revisão dos princípios de interação entre luz e matéria, na perspetiva de compreender o sistema de leitura de resultados desenvolvido. Por fim apresenta-se uma breve introdução acerca das patologias para as quais foram desenvolvidas aplicações, juntamente com alguns fundamentos importantes para os métodos de diagnóstico.

1.1 Placas de microtitulação

Uma placa de micro titulação (ou microplaca) consiste num tabuleiro plano com vários compartimentos individuais (poços) dispostos em linhas e colunas, formando uma matriz 2:3. Os formatos mais utilizados possuem 96 ou 384 poços (Figura 1.1). São fabricadas a partir de um polímero (poliestireno ou polipropileno) e são utilizadas para examinar as características físicas, químicas ou biológicas de várias amostras em paralelo. As amostras ficam dispostas na matriz formada pelos poços da placa [1].

A invenção desta ferramenta remonta a 1951, quando o médico e inventor húngaro, Dr. Gyula Takátsy, construiu à mão a primeira microplaca. Numa placa de acrílico construiu 6 linhas de 12 poços que juntamente um dispositivo de deposição com várias pontas, permitiam a realização de vários ensaios em simultâneo. Esta invenção surgiu no contexto de uma epidemia de gripe na Hungria, que suscitou a procura de um método de diagnóstico rápido económico e eficaz. Realizando vários ensaios em simultâneo, a invenção de Dr. Takátsy permitiu reduções significativas no tempo de realização e volumes de amostra utilizados por cada teste, o que aumentou significativamente o rendimento do seu laboratório. Desde então as microplacas evoluíram, tornando-se num dos equipamentos descartáveis mais comuns em laboratórios. O formato mais convencional consiste em 96 poços individuais dispostos em oito linhas e doze colunas com dimensões definidas pelo *American National Standards Institute*, em 1996 [2], [3]. Além deste formato existem microplacas com 2, 4, 6,

12, 24, 384, 1536, 3456 e 9000 poços. De referir que todos os formatos de microplaca referidos têm, o mesmo tamanho, pelo que as diferenças entre os formatos residem no tamanho e densidade de poços. O avanço tecnológico tem permitido uma crescente miniaturização de vários tipos de ensaios laboratoriais, o que tem motivado a procura de microplacas com poços menores e maior densidade de poços de modo a aumentar o rendimento dos laboratórios e diminuir a quantidade de reagentes necessária por cada ensaio.

A)



B)



Figura 1.1 - A) Microplaca transparente de poliestireno com 96 poços [4]; B) Microplaca preta de poliestireno com 384 poços [5]

1.1.1 Aplicações e evolução

As microplacas têm um vasto historial de aplicações em virologia e serologia, por exemplo em hemaglutinação (reconhecimento de anticorpos específicos) onde os seus poços são usados para fazer diluições seriadas.

Ensaio ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assays*) foram desenvolvidos nos anos 70 como alternativa a técnicas como RIA (*Radio-ImmunoAssay*). Deste modo, os ensaios ELISA potenciaram o desenvolvimento e otimização de ensaios imunológicos para uma grande variedade de aplicações em investigação e diagnóstico clínico. As microplacas são ainda hoje consideradas o suporte mais adequado para este tipo de aplicações. Nos anos 80 o desenvolvimento de novas tecnologias como o PCR (*Polymerase Chain Reaction*) levou ao desenvolvimento e otimização de microplacas específicas para ensaios de PCR. Por outro lado, o aparecimento de HTS (*High Throughput Screening*) para deteção e descoberta de novas drogas suscitou a procura por placas com maior densidade de poços de modo a aumentar o rendimento das análises. Nas últimas décadas, o desenvolvimento de novas tecnologias levou ao aparecimento de novas aplicações para as microplacas, bem como de sistemas periféricos para facilitar o seu uso. [2], [6], [7]

A evolução desta ferramenta levou a que, hoje em dia, existam milhares de microplacas com diferentes densidades de poço, cores, materiais de fabrico (específicos para diferentes sistemas de deteção) e revestimentos (para imobilização de biomoléculas nos poços). Na Tabela 1.1 podem observar-se algumas opções de microplacas com revestimentos comerciais.

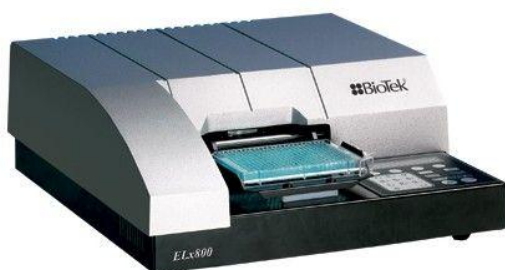
Tabela 1.1 - Tipos de revestimento de microplacas [6].

Superfície	Interação de ligação	Propriedades da ligação	Aplicações
Carbo-BIND™ poliestireno	Imobilização covalente por grupos hidrazida	Biomoléculas com carboidratos disponíveis para ativação	Ensaio que requerem orientação da biomolécula
DNA-BIND™ poliestireno	Imobilização covalente para grupos amina	Biomoléculas de tamanho pequeno e médio (DNA com grupo amina disponível)	Imobilização de pequenos antígenos (aminoácidos singulares), oligonucleótidos aminados.
Universal-BIND™ poliestireno	Imobilização covalente por ligação cruzada UV com hidrogénio.	Biomoléculas com hidrogénio disponível para auto-oxidação	Imobilização de antígeno com DNA de cadeia dupla de estrutura desconhecida
High Binding poliestireno	Hidrofóbica e iónica (carregada negativamente)	Melhora a ligação de biomoléculas grandes (>10 kD) carregadas positivamente ou sem regiões hidrofóbicas	EIA (Enzyme Immunoassay) e RIA.
Osteo Assay Plate	Superfície para crescimento e diferenciação de células ósseas	Superfície sintética que providencia condições ao crescimento do osso	Crescimento e diferenciação de osteoclasto e osteoblasto
Synthemax	Superfície sintética com péptido ligado a um revestimento de hidrogénis	Imobilização de células estaminais por ligação peptídica	Imobilização, expansão e diferenciação de células estaminais

1.1.2 Sistemas periféricos de manuseamento e leitura de resultados

Paralelamente à evolução das microplacas surgiu um mercado de instrumentação periférica na forma de dispositivos de manuseamento de líquidos e espectrofotómetros automatizados (Figura 1.2) especialmente desenvolvidos para operar com o formato das microplacas.

A)



B)



Figura 1.2 - A) Leitor de microplacas [8]; B) Sistema de deposição de reagentes [9].

Existe uma gama variada de sistemas de manuseamento de líquidos, desde pipetas manuais para deposição de reagentes em poços individuais ou em vários poços em simultâneo, a dispositivos automatizados capazes de depositar vários reagentes, aspirar, lavar, misturar, incubar, secar o conteúdo de alguns colunas de poços ou de toda a placa simultaneamente [2].

Os leitores de microplacas são espectrofotômetros e/ou espectralfluorímetros usados para analisar resultados de ensaios realizados em microplacas e são instrumentos extensivamente validados para uma vasta gama de aplicações em laboratórios e clínicas [10].

De uma forma geral as microplacas facilitam a realização de ensaios reduzindo tanto a sua duração como a quantidade de equipamento periférico necessário (relativamente a ensaios a uma escala superior). Por outro lado, parte da versatilidade das microplacas resulta do vasto leque de opções de funcionalização, seja pela modificação química da superfície dos seus poços como pela adaptação da instrumentação externa específica para determinadas aplicações. O uso de sistemas automatizados de manuseamento de líquidos permite diminuir o tempo de realização de vários ensaios simultâneos e reduzir o erro associado ao utilizador.

1.2 Papel

O papel é uma substância composta por fibras entrelaçadas numa rede compacta, normalmente em forma de uma folha fina e flexível. A sua invenção remonta a 105 d.C. e é atribuída a Ts'ai Lun, ministro da agricultura do imperador Chinês Ho Ti's. Ts'ai Lun aperfeiçoou um processo de fabrico de papel a partir de cascas, pedaços de bambu, redes de pesca e algodão, produzindo papel de alta qualidade mesmo pelos padrões atuais [11]. O papel é uma parte essencial da civilização há mais de 200 anos e tende a ser encarado com um material simples e ordinário. No entanto este material tem origem vegetal, pelo que apresenta grande complexidade a nível morfológico, físico e químico. O próprio processo de produção é altamente sofisticado, envolvendo engenharia e tecnologia de vanguarda [12].

Ainda que impressão, escrita e embalagem sejam as principais aplicações do papel, existem muitos outros produtos que são feitos a partir do mesmo processo (lenços, cartão, filtros, etc.), sendo difícil apresentar uma definição baseada nas suas características macroscópicas. Deste modo, no âmbito deste trabalho, define-se papel com base no seu processo de fabrico: é uma folha de um material feito de uma rede de fibras de celulose, depositadas a partir de uma suspensão aquosa. O produto final é uma rede de fibras interligadas estruturada em camadas, com espessura compreendida entre 30 e 300 μm [13].

1.2.1 Composição química

O papel é produzido a partir de fibras que, antes dos tratamentos químicos e mecânicos, faziam parte de células de plantas terrestres. Como tal, este material não tem uma composição química única, variando em função da fonte da fibra. As células das plantas terrestres são maioritariamente compostas por polímeros de hidratos de carbono ou polissacarídeos (celuloses e hemiceluloses), impregnados com lenhina.

O carboidrato mais abundante na composição do papel é a celulose, pelo que as propriedades físicas e mecânicas da folha de papel se devem às fibras celulósicas. Celulose de origem natural é um polissacarídeo linear homogéneo baseado em monómeros de glucose (β -1,4-d-glucopirranose), com grau de polimerização entre 3000 e 15000. Este polissacarídeo encontra-se presente na parede celular, assumindo funções estruturais importantes (Figura 1.3). Quimicamente são as ligações por pontes de hidrogénio entre os grupos hidroxilo dos monómeros de glucose que constituem a forte interação existente entre as moléculas de celulose e originam a formação das fibras. Também na formação da folha de papel é esta interligação por pontes de hidrogénio que

proporciona a interação entre as fibras de celulose que constituem o papel, concedendo a resistência necessária para a sua formação [13].

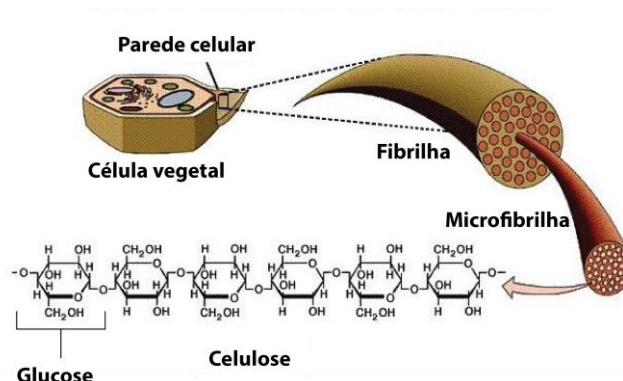


Figura 1.3 - Estrutura da celulose e sua organização na parede celular (adaptado de [14]).

As hemiceluloses são um grupo de polissacarídeos heterogêneos, não estruturais e com baixo peso molecular, que não estão relacionados com a celulose, uma vez que são formados bio sinteticamente por outra via. Não são, como o nome sugere, precursores para a celulose e a sua função na parede celular não é ainda muito clara, uma vez que o seu peso molecular é muito baixo para desempenharem funções estruturais. As hemiceluloses são no entanto benéficas para as propriedades da pasta e conseqüentemente, do papel, muito embora as razões para tal não sejam ainda totalmente claras. A resistência à tração do papel, por exemplo, correlaciona positivamente com o conteúdo de hemicelulose [13].

A lenhina é um polímero aromático presente na madeira com uma estrutura complexa, que representa entre 17 a 23 % do peso de madeira seca. Funciona como um agente de fortalecimento da estrutura da madeira e também assiste na resistência da madeira a ataques de microrganismos e apodrecimento. A lenhina é formada apenas nas plantas vasculares e no caso da madeira providencia à árvore força e propriedades elásticas. Quase todas as propriedades da lenhina são indesejáveis para o fabrico de papel. As melhores qualidades de papel são normalmente feitas a partir de pastas das quais a maioria da lenhina foi retirada. A presença de lenhina torna o papel frágil, e devido a oxidação fotoquímica, amarelado e escurecido. A lenhina encontra-se apenas em pastas provenientes de madeira, pelo que o processo de fabrico engloba vários tratamentos no sentido de a remover [13].

Na Tabela 1.2 podem observar-se as quantidades relativas dos principais constituintes de fibras provenientes de diversas plantas.

Tabela 1.2 - Quantidade relativa de celulose, hemicelulose, pectina e lenhina na constituição de fibras de plantas [15].

Fibra	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lenhina (%)	Sub-total (%)	Outros (%)
Algodão	82,7	5,7	0,0	88,4	11,6
Cânhamo	67,0	16,1	3,3	87,2	12,8
Juta	64,4	12,0	11,8	88,4	11,6
Ramie	68,8	13,1	0,6	84,4	15,6
Sisal	65,8	12,0	9,9	88,5	11,5

1.2.2 Propriedades

Considerando a variedade de tipos de papel com diferentes finalidades, é necessário abordar algumas propriedades deste material. Na perspectiva de papel bioativo elegeram-se cinco propriedades críticas para desenvolvimento de microplacas de papel: espessura, porosidade, química superficial (*surface chemistry*), propriedades óticas e resistência em húmido (*wet strength*) [16], [17].

A porosidade é a medida do total de espaços vazios entre as fibras do papel. A porosidade de uma folha de papel é uma indicação da sua absortividade, ou seja, da capacidade de absorver tinta ou água. Como o papel é constituído por várias camadas de fibras numa disposição aleatória tem vários graus de porosidade, podendo conter até 70% de ar [17].

Para aplicações bio analíticas, as propriedades químicas superficiais do papel deve facilitar a imobilização de biomoléculas, minimizar adsorção inespecífica e ser compatível com estratégias de revelação [16].

Para uma determinada gramagem de papel, a espessura determina o seu volume e densidade. Variações na espessura afetam as propriedades óticas e resistência do papel.

As propriedades óticas de maior importância para o trabalho são opacidade, brilho e cor. A opacidade é a medida da quantidade de luz que é absorvida pela folha de papel. Um papel totalmente opaco é aquele que bloqueia a passagem de toda a luz visível. A opacidade é influenciada pela espessura, quantidade de aditivos, processo de branqueamento e revestimento.

A resistência em húmido determina a capacidade de o papel suportar deformações enquanto está molhado. Alguns tipos de papel como filtros de café e chá são específicos para entrar em contacto com água, pelo que têm que manter resistência mesmo quando saturados com água. Para aumentar a resistência húmida o papel é processado quimicamente [16], [18].

1.3 Microfluídica

A microfluídica é uma área emergente da ciência e tecnologia que se refere à manipulação e processamento de volumes de fluídos na ordem dos micro ou nano litros. Utiliza sistemas e dispositivos de dimensões reduzidas onde são implementados canais com geometrias micro ou nanométricas através dos quais os fluídos são conduzidos até regiões de interesse. A microfluídica apresenta diversas vantagens sobre as tecnologias convencionais. A redução do consumo de reagentes, do tempo de obtenção de resultados e a simplicidade da sua análise, associadas à facilidade de produção em massa tornam a microfluídica muito atrativa. Atualmente encontra-se presente em domínios da biologia, química, medicina e materiais [19–21].

1.3.1 Microfluídica em papel

A microfluídica em papel utiliza papel como substrato, ou seja, o controlo dos volumes é feito no interior do papel. O papel é, inequivocamente, um material orgânico muito barato e é compatível com a grande maioria das aplicações químicas, bioquímicas e médicas. Para além disso, a rede fibrosa que o constitui permite o transporte de líquidos através de forças capilares. Capilares são tubos com diâmetros muito reduzidos de dimensão microscópica ou inferior. Quando a aderência do líquido às paredes do capilar, na presença do ar, excede a coesão do próprio líquido, este tende a espalhar-se pelo sólido (fenómeno de *wetting*). Nestas condições a superfície livre encurva, o ângulo

de contacto é inferior a 90° e a tensão superficial pode ser suficiente para fazer o líquido deslocar-se pelo capilar. Este é o fenómeno conhecido por capilaridade [22].

Washburn demonstra que a taxa de penetração de um líquido num tubo por ação capilar, é diretamente proporcional ao raio do capilar, ao ângulo de contacto, ao rácio entre a tensão de superfície e a viscosidade e inversamente proporcional ao comprimento do percurso já preenchido pelo líquido. Quando o ângulo de contacto é inferior a 90°, ou seja, quando o líquido molha o capilar, a taxa de penetração é independente do ângulo de contacto. Para materiais porosos que se comportam como um conjunto de capilares cilíndricos, a equação de Washburn descreve a penetração do líquido em função do tempo, de acordo com a expressão [23]:

$$L = \sqrt{\frac{\gamma D t}{4\eta}} \dots\dots\dots \text{equação 1.1}$$

Onde L é a distância percorrida por um líquido de viscosidade η e tensão superficial γ , num substrato poroso com poro médio D, durante um intervalo de tempo t.

Na microfluídica em papel a condução dos fluídos é realizada pela rede de fibras do papel. Esta rede de fibras dispersas aleatoriamente gera espaços livres que se comportam como tubos capilares. Através da pressão capilar, os líquidos são conduzidos sem necessidade de aplicar uma força externa. É deste modo um método autossuficiente, pois o transporte dos fluídos não necessita da aplicação de forças externas. O manuseamento de líquidos no papel é conseguido pela construção de canais hidrófilos de papel, onde os líquidos são conduzidos por ação capilar, delimitados por regiões onde as propriedades do papel são alteradas de modo a impedirem a propagação do fluxo.

1.4 Sistema de leitura dos resultados

Espectrofotómetros de UV/visível são equipamentos usados há mais de 35 anos e durante esse período tornaram-se nos mais importantes instrumentos de análise em laboratórios modernos.

Quando um feixe de luz interage com uma amostra a luz pode ser totalmente refletida, o que faz com que a amostra tenha cor branca, ou pode ser totalmente absorvida se a amostra for preta. No entanto, se apenas uma porção de luz for absorvida e a restante for refletida, a cor da amostra é determinada pela luz refletida. Existem muitas substâncias que não exibem cor, pelo que não têm um espectro de absorção de luz no intervalo de comprimentos de onda visíveis. Nestes casos a absorção ocorre na zona infravermelha ou ultravioleta do espectro eletromagnético. Existe uma relação próxima entre a cor de uma substância e a sua estrutura atómica. Uma molécula ou ião absorvem comprimentos de onda visíveis quando a radiação provoca uma transição eletrónica nas orbitais dos seus átomos. Quando um feixe de radiação incide num objeto pode ser absorvido, transmitido, dispersado, refletido ou pode provocar fluorescência. Na Figura 1.4 pode observar-se uma ilustração destes processos.

O fenómeno envolvido na espectrofotometria de absorvância é a absorção. Nas medições de refletância o fenómeno de interesse é a reflexão. Na região visível do espectro eletromagnético as bandas observadas não são suficientemente específicas para identificar amostras desconhecidas. Espectrofotometria em comprimentos de onda visíveis é usada maioritariamente para quantificação, ou seja, estimar a quantidade de um determinado composto presente numa amostra. A lei de Lambert-Beer define que a concentração de uma substância é diretamente proporcional à absorvância (A_λ) da solução [24].

$$A_\lambda = l \cdot \epsilon_\lambda \cdot c \dots\dots\dots \text{equação 1.2}$$

Onde ϵ_λ = absorvidade da substância, c = concentração, l = percurso ótico. Mantendo ϵ_λ e l constantes para um determinado conjunto de medidas da mesma amostra, um gráfico de absorvância em função da concentração deve ser uma linha reta. Da lei de Lambert-Beer resulta também que o percurso ótico pode ser alterado para afetar a absorvância, representando uma vantagem quando são necessários limites de detecção inferiores (aumentar percurso ótico), ou superiores (vice-versa) [24].

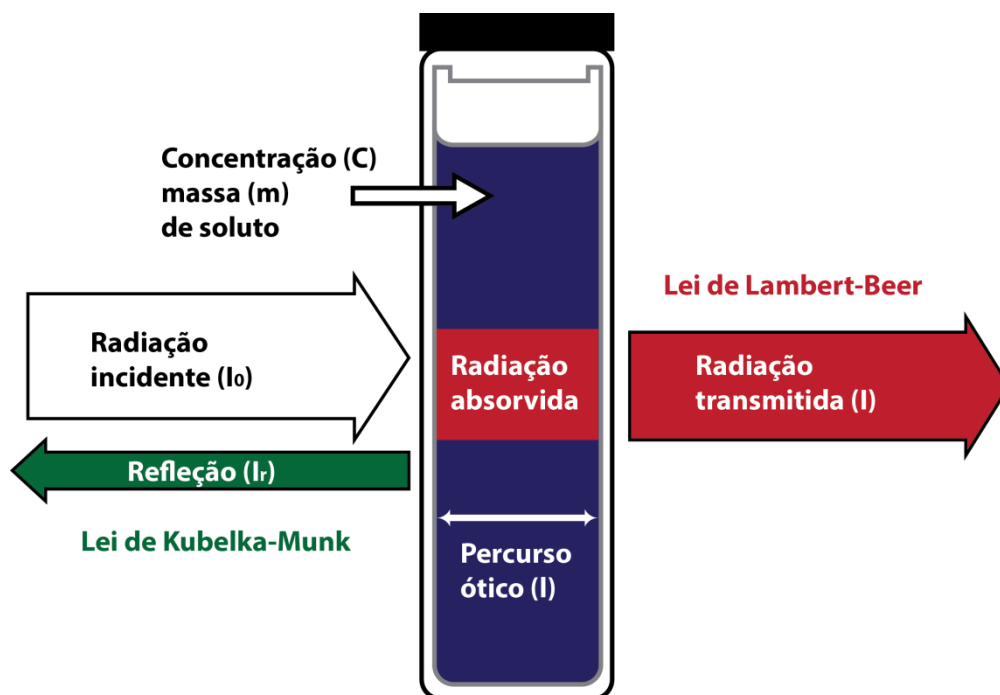


Figura 1.4 - Interação de um feixe de luz com uma amostra (adaptado de [25]).

A refletância do feixe de luz numa superfície, como função da quantidade de uma amostra colorida uniformemente distribuída pode ser expressada pela equação:

$$R = \frac{I_r}{I_0} = R_w \cdot e^{-k_1 \cdot m} \dots \dots \dots \text{equação 1.3}$$

Onde R = refletância, I_r = intensidade da parte do feixe refletida, I_0 = intensidade do feixe incidente, R_w = refletância da superfície branca de referência, k_1 = constante e m = massa por unidade de área da substância. Esta relação denomina-se lei de Kubelka-Munk [26–29].

1.5 Aplicações desenvolvidas

1.5.1 Diagnóstico de leishmaniose canina: ensaio ELISA

A Leishmaniose é uma das doenças infecciosas do mundo mais preocupantes e encontra-se difundida no Mediterrâneo, África, Médio Oriente, Ásia e América do Sul. É transmitida através da picada de um mosquito do género *Phlebotomus* e pode ser uma doença sistêmica grave, de curso lento e crônico.

Os parasitas do género *Leishmania*, responsáveis pela doença, apresentam duas formas no seu ciclo de vida: uma forma promastigota flagelada (Figura 1.5) encontrada no trato digestivo do vetor (flebotomo) e uma forma amastigota, que se desenvolve no interior dos macrófagos dos

hospedeiros vertebrados. Apenas as fêmeas dos mosquitos *Phlebotomus* transmitem a doença através de picada na pele e consequente inoculação dos promastigotas no sangue dos hospedeiros. Os parasitas são então interiorizados pelos macrófagos e transformam-se na sua forma amastigota, perdendo o flagelo. No hospedeiro, sobrevivem e multiplicam-se numa relação de parasitismo complexa. Existem mais de vinte espécies de *Leishmania* e cada uma apresenta exigências ecológicas, vetores e hospedeiros diferentes [30].

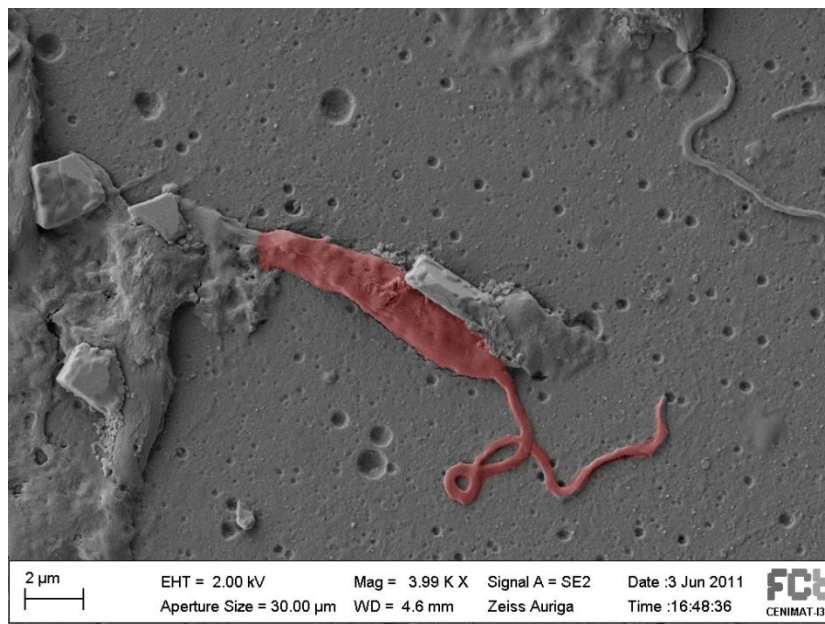


Figura 1.5 - Imagem de microscopia eletrônica de uma *Leishmania* na forma promastigota, num substrato de vidro (coloração artificial feita em Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated, California, USA))

A Leishmaniose Visceral (VL - *Visceral Leishmaniasis*) apresenta elevada taxa de mortalidade em humanos infetados e é considerada como um grave problema de saúde pública em vários países [31]. É causada por duas espécies, *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*, dependendo da área geográfica. *L. infantum* é responsável pela difusão da doença na Europa, norte de África e América Latina e infecta principalmente crianças e indivíduos imunossuprimidos. *L. donovani* infecta todas as faixas etárias e encontra-se difundida pelo leste de África e Índia. Após um período de incubação entre dois e seis meses, os pacientes infetados com VL apresentam sintomas e sinais persistentes de infeção que incluem febre, fadiga, fraqueza, perda de apetite e de peso [32].

A doença é endémica maioritariamente em países pouco desenvolvidos ou em regiões rurais remotas. Pacientes e familiares afetados pela VL vêm o seu nível económico diminuir devido a custos diretos da doença, como custos de diagnóstico e tratamento, e custos indiretos, relacionados com fatores como perda do trabalho e habitação [32].

O diagnóstico e tratamento precoce da VL são considerados uma ferramenta essencial no controlo da doença. Sendo uma infeção zoonótica, também para a medicina veterinária estes componentes são de extrema importância, uma vez que o cão é considerado o hospedeiro principal do parasita.

Existe atualmente uma enorme variedade de testes de diagnóstico imunológico, devido especialmente ao desenvolvimento e otimização de métodos de marcação de antígenos e anticorpos. A marcação destas proteínas permite a implementação de testes de diagnóstico com grande nível de sensibilidade e especificidade. De entre os variados métodos de marcação

desenvolvidos nas últimas décadas do século XX, o mais promissor utiliza enzimas. Enzimas podem ser conjugadas com anticorpos e antígenos de modo a formar complexos que mantêm a atividade imunológica e enzimática. A degradação enzimática de um substrato cromogénico resulta na amplificação de sinal e permite a deteção específica da enzima [33], [34].

Ensaio ELISA são utilizados para diagnóstico de doenças infecciosas, onde regularmente é necessário avaliar a resposta imunitária através da quantificação de anticorpos específicos. Nestes casos o método indireto, representado esquematicamente na Figura 1.6, é particularmente aplicável.

No método indireto o antígeno é imobilizado no suporte da reação. A amostra de soro é então adicionada e incubada permitindo a ligação entre os anticorpos específicos e o antígeno imobilizado. Após uma fase de lavagem, que elimina os componentes serológicos que não reagiram, é adicionado e incubado o anticorpo conjugado com enzima. Este conjugado vai ligar-se aos anticorpos que se encontram já ligados ao antígeno imobilizado. Segue-se uma fase de lavagem de modo a remover o conjugado em excesso que não reagiu com os componentes imobilizados. Finalmente é adicionado o substrato da enzima cuja alteração colorimétrica, resultante da reação catalisada pela enzima do conjugado, é proporcional à quantidade de conjugado imobilizado e consequentemente proporcional à quantidade de anticorpos específicos presentes na amostra de soro [33], [35], [36].

Os ensaios ELISA podem também ser utilizados para deteção de antígenos através do método *sandwich*. Este método é assim denominado uma vez que utiliza a ligação entre um antígeno e dois anticorpos distintos para a sua identificação. Na Figura 1.6 encontra-se uma ilustração representativa desta técnica. Neste método um anticorpo específico para o antígeno que se pretende detetar é imobilizado no contentor da reação. Após reação com a amostra de soro, é adicionado um conjugado enzimático de anticorpo específico e, seguidamente, o substrato da enzima. O antígeno presente na amostra testada é assim capturado pelo anticorpo imobilizado. De seguida o anticorpo conjugado com enzima é incubado, ligando-se aos antígenos previamente imobilizados [33].

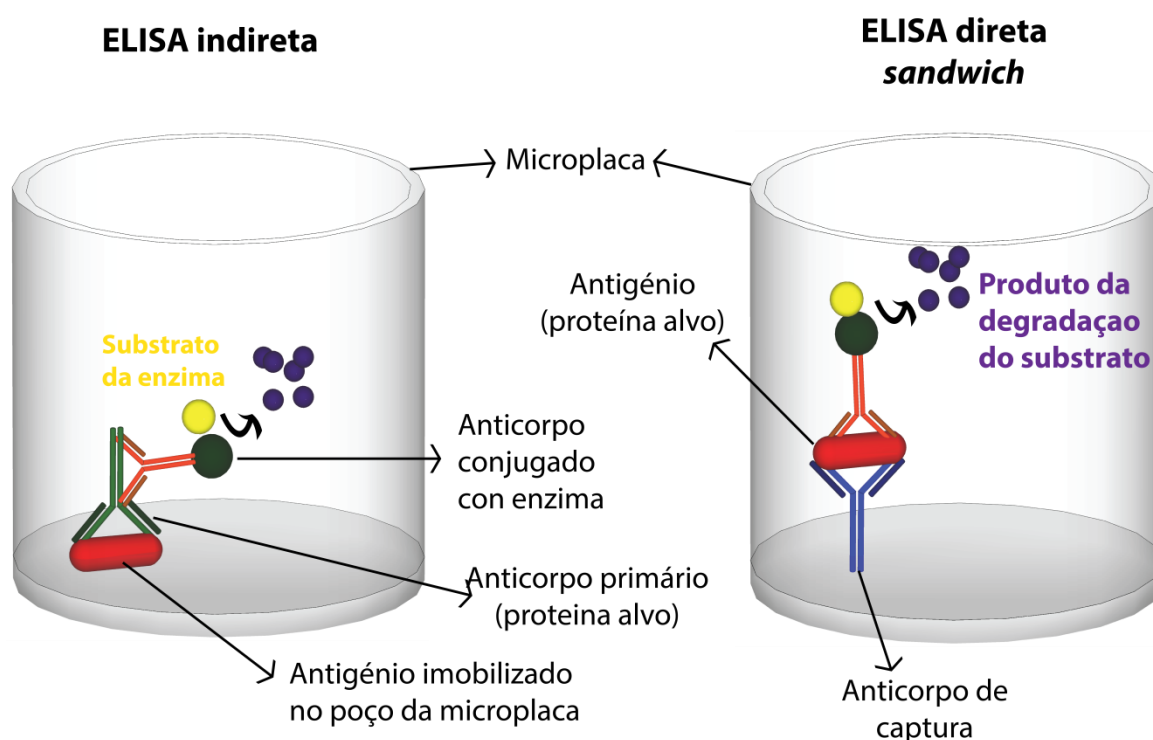


Figura 1.6 -ELISA indireta e ELISA direta.

O formato de um teste de diagnóstico determina se o método tem valor prático em laboratório. Idealmente procura-se reduzir o custo de produção bem como simplificar a revelação dos resultados, de modo a dispensar a utilização de equipamentos complexos e potencialmente dispendiosos. Na concretização deste objetivo um dos fatores a ter em conta é a escolha do suporte onde se realiza o ensaio, visto que tem um papel ativo na imobilização de reagentes. Desde a sua invenção, diversos substratos têm sido utilizados em ensaios imuno enzimáticos. Atualmente os polímeros poliestireno e polipropileno possuem uma vasta gama de funcionalizações para imobilização de biomoléculas.

1.5.2 Diagnóstico de tuberculose: deteção com nanossondas de ouro

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada principalmente pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, Mtb), um membro do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). Tipicamente afeta os pulmões, (TB pulmonar) mas pode afetar outros órgãos (TB extrapulmonar). A doença é transmitida por via aérea através da expulsão de bactérias por pessoas infetadas. Em geral, apenas uma pequena parcela das pessoas infetadas com Mtb desenvolve a doença, no entanto, sem tratamento a taxa de mortalidade é elevada.

Avanços recentes no diagnóstico molecular da tuberculose melhoraram a capacidade de deteção do agente patogénico, mas a maioria destes métodos requerem técnicos especializados e equipamento laboratorial complexo e dispendioso. Um diagnóstico POCT (Point Of Care Test) é crucial para o controlo da tuberculose, pois a identificação e caracterização rápidas do agente patogénico permitem o tratamento precoce, passo vital para o combate desta pandemia. Neste sentido foi desenvolvido, em conjunto com o Centro de Investigação em Genética Molecular Humana (CIGMH) do Departamento de Ciências da Vida da FCT-UNL, um dispositivo para diagnóstico molecular da tuberculose que utiliza o papel como suporte e que foi recentemente publicado numa revista científica internacional [37].

Neste dispositivo o reconhecimento molecular é feito através da hibridação de uma sequência de ADN conhecida, a sonda, com uma sequência de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) desconhecida, o alvo. A sequência de ADN sonda é acoplada com um transdutor, especificamente nanopartículas de ouro (AuNPs - *gold nanoparticles*) funcionalizadas, que permite identificar a ocorrência da hibridação. As AuNPs são conjuntos de átomos de ouro (entre 3 e 1×10^7 átomos) e possuem propriedades extraordinárias, como comportamento espectral ajustável e facilidade de funcionalização com biomoléculas como anticorpos ou ADN [38].

A agregação é o processo pelo qual duas ou mais partículas se agrupam (agregado), As AuNPs encontram-se estabilizadas por uma camada superficial de iões que mantêm uma carga fixa e do mesmo sinal, promovendo a repulsão electrostática e mantendo-as afastadas (cineticamente estáveis). No entanto, por adição de um eletrólito, a força iónica do meio é aumentada, atenuando a repulsão electrostática entre as partículas e a suspensão coloidal passa a ser cineticamente instável, originando a agregação [39]. O campo magnético da luz movimenta coletivamente os eletrões condutores induzindo dipolos instantâneos. Esta oscilação forma um dipolo oscilante efetivo que anula a radiação eletromagnética com a mesma frequência. Este fenómeno, denominado

ressonância de plasmônica (SPR - *Surface Plasmon Ressonance*) é evidenciado pela presença de uma forte banda na região do visível, e é responsável pelas cores vivas que as AuNPs apresentam. A frequência de ressonância depende da separação das cargas opostas à superfície, que é função do tamanho, geometria da partícula e da polarização do meio [39–41].

Macroscopicamente o ouro tem cor amarela, mas nanopartículas esféricas com tamanhos entre 10 e 20 nm assumem uma intensa coloração vermelha, resultante da frequência à qual se verifica a SPR (520 nm). A agregação das partículas provoca um alastramento da banda SPR para comprimentos de onda mais elevados (600 nm), como se pode observar na Figura 1.7.

Estas AuNPs podem ser diretamente funcionalizadas com oligonucleótidos tiolados, e podem ser utilizadas numa grande diversidade de estratégias de detecção para reconhecimento de sequências específicas de RNA ou DNA (Figura 1.7). Estas AuNPs funcionalizadas são denominadas nanossondas de ouro [38], [42], [43].

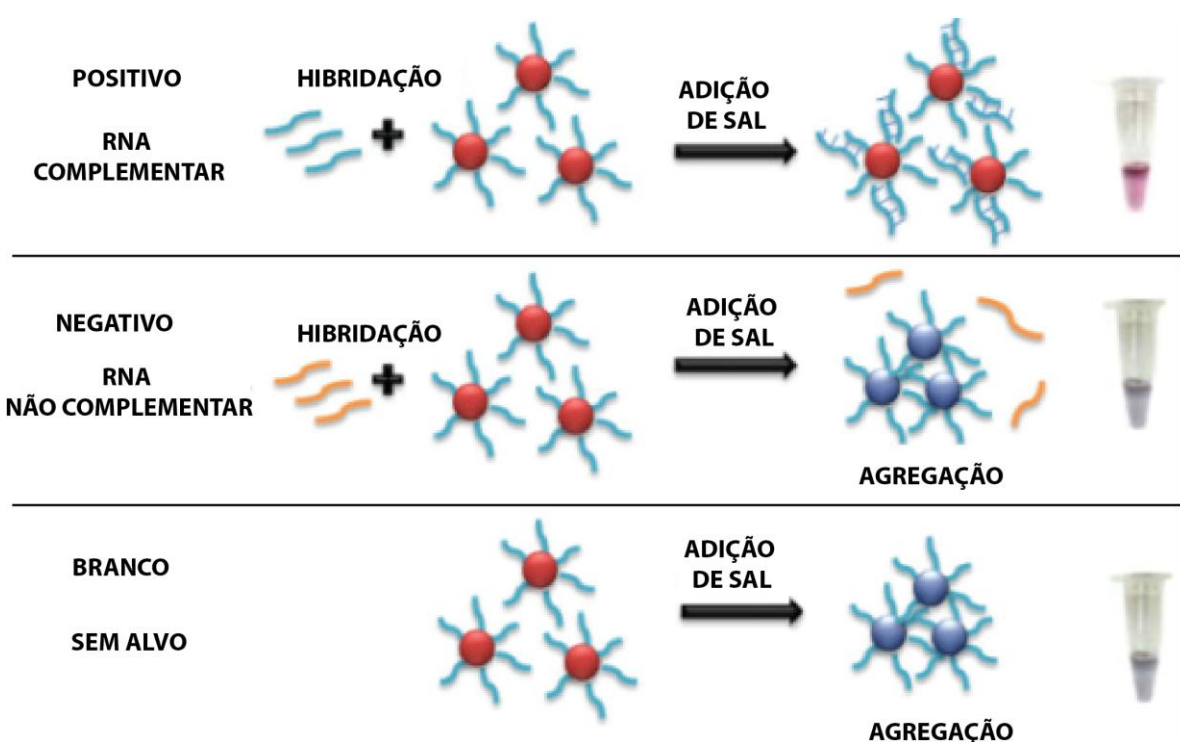


Figura 1.7 - Ensaio de hibridação *non-cross-linking* com nanossondas de ouro. O aumento da força iônica provoca a agregação das nanossondas (solução azul), que é impedida pela presença da sequência alvo complementar (adaptado de [44])

Capítulo 2

Técnicas de caracterização

Neste capítulo é feita a revisão teórica acerca das técnicas usadas para caracterizar os substratos e material de impressão. São também descritas as condições experimentais de cada ensaio realizado.

2.1 Microscopia eletrônica de varrimento e espectroscopia dispersiva de raios-X

O microscópio eletrônico de varrimento (SEM - do inglês *Scanning Electron Microscopy*) é um dos instrumentos mais versáteis para análise morfológica de objetos sólidos. Esta técnica permite a observação e caracterização de materiais heterogêneos numa escala de nanômetros (nm). A elevada profundidade de foco possibilita a obtenção de imagens com efeito tridimensional, fornecendo mais informação acerca da morfologia em estudo.

Os componentes base deste tipo de equipamento são um sistema de lentes, uma fonte de elétrons, um coletor de elétrons e um ou vários tubos de raios catódicos (CRT - do inglês *Catode Ray Tube*). No SEM, a área a ser analisada é irradiada com um feixe de elétrons que pode efetuar um varrimento na superfície da amostra para formar uma imagem ou incidir numa pequena área para análise elementar. A interação entre os elétrons do feixe e a matéria da amostra resulta na emissão de elétrons secundários, elétrons retro difundidos, raios-X característicos e outros fótons. Em cada ponto da amostra em que o feixe de elétrons primários incide detetores captam os elétrons secundários emitidos. O sinal resultante dos elétrons secundários é amplificado e aplicado no emissor de elétrons do CRT, modelando o número de elétrons a incidir na tela do CRT e consequentemente, o brilho de cada *pixel*. A imagem final é formada sincronizando as coordenadas de cada ponto na amostra com um ponto no CRT [45]. O feixe de elétrons primários do equipamento utilizado pode atingir energias entre 0,1 e 30 keV, permitindo ampliações de 12x a 1000000x [46].

Paralelamente o equipamento utilizado permite fazer uma análise química da amostra medindo a energia e intensidade dos fótons emitidos pela amostra irradiada pelo feixe de elétrons primários. Em espectroscopia dispersiva de raios-X (EDS do inglês *Energy Dispersive X-Ray spectroscopy*) os detetores produzem um sinal proporcional ao número de fótons raios-X na área de incidência do feixe. Uma vez que cada elemento emite um espectro de raios-X característico, por

computação do sinal e comparação com referências bem estabelecidas, é extrapolada a concentração relativa de cada elemento atômico presente na amostra. Efetuando milhares de varrimentos sobre uma determinada zona da amostra, os detetores formam um mapa espacial dos elementos constituintes da amostra. Os resultados de todos os varrimentos são dispostos num espectro de contagens em função da energia dos raios-X. Esta técnica está limitada a elementos de número atômico superior a 5, pelo que apenas são detetados elementos mais pesados que o boro [45], [47].

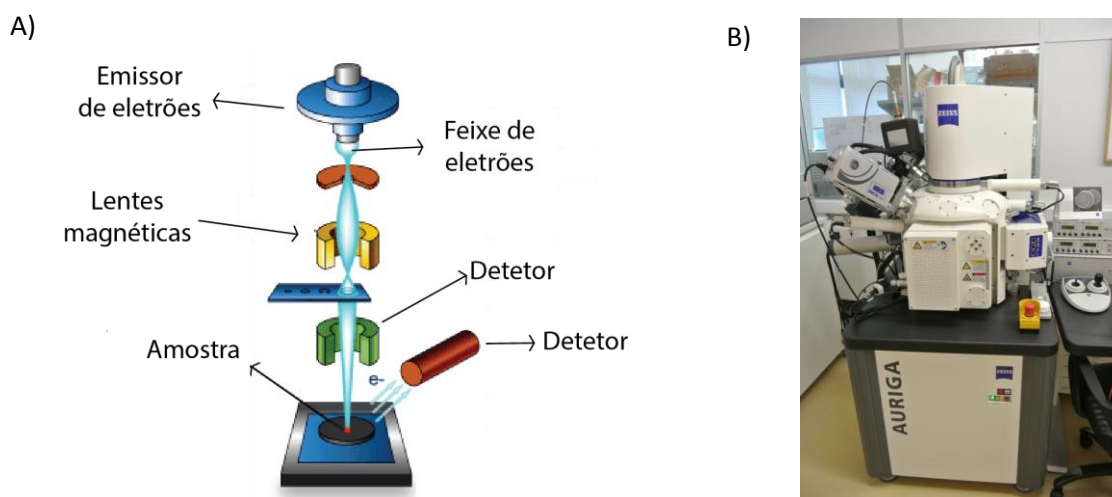


Figura 2.1 - A) Representação esquemática do SEM (adaptado de [48]); B) Carl Zeiss AURIGA Crossbeam SEM-FIB existente no CENIMAT/I3N

Todas as imagens de SEM apresentadas neste trabalho foram obtidas com o equipamento Carl Zeiss AURIGA Crossbeam SEM-FIB (Figura 2.1). Para obtenção de imagens utilizou-se o modo de elétrons secundários com uma tensão de aceleração de 2 kV. A abertura do diafragma foi de 30 μm e usou-se uma distância de trabalho de 5 mm entre a coluna de SEM e a amostra. Para evitar acumulação de carga na superfície das amostras foi aplicado um revestimento de 10 nm de uma liga de ouro e paládio. A análise EDS foi realizada através do detetor Oxford INCA x-act, usando uma tensão de aceleração de 15 kV e uma abertura de diafragma de 60 μm . As amostras de papel analisadas por EDS foram revestidas com 10 nm da liga de ouro/paládio. Na análise EDS da plataforma *Gold on paper* usou-se um revestimento de crómio com 17 nm de espessura.

2.2 Ângulo de Contacto

O ângulo de contacto é a medição da capacidade de um líquido se espalhar numa determinada superfície. É convencionalmente medido através do líquido, quando uma interface líquido/vapor contacta uma superfície sólida. O método consiste em medir o ângulo entre a tangente à superfície da gota depositada e a superfície do sólido, ou seja, o ângulo entre a interface líquido/sólido e líquido/vapor. Através desta técnica quantifica-se afinidade de uma superfície sólida a um líquido através da equação de Young. Na Figura 2.2 está representado o esquema do perfil de uma gota com os ângulos e forças envolvidas no processo e o equipamento usado nas medições.

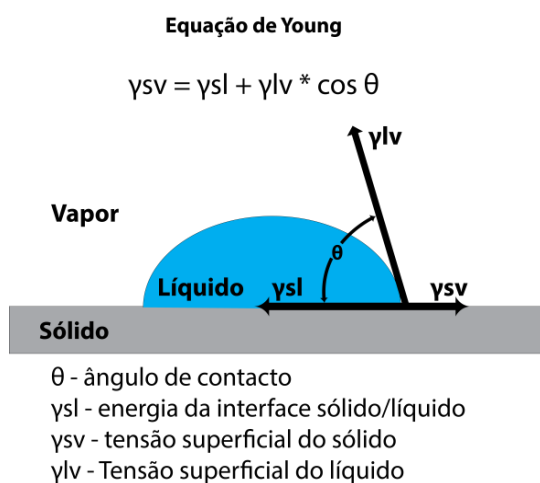
Quando uma gota é depositada numa superfície planar, o ângulo entre a tangente à superfície da gota no ponto de contacto e a superfície do sólido é denominado ângulo de contacto (θ). O ângulo de contacto permite avaliar a capacidade de uma determinada superfície sólida

absorver um determinado material líquido. Quando uma gota de líquido é depositada numa superfície lisa, as forças de adesão entre o sólido e o líquido são maiores que a força de coesão do líquido, causando um espalhamento uniforme do líquido pela superfície. Se as forças atingirem um equilíbrio determinado pelas tensões superficiais (γ_{lv} , γ_{sv} e γ_{sl}), a gota forma um ângulo de contacto com a superfície. No entanto o papel é um material poroso, pelo que a gota não forma uma superfície de contacto plana com a superfície e a tensão superficial da interface não é constante. Para um poro cilíndrico define-se a diferença de pressão (Δp) na interface de acordo com a equação:

$$\Delta p = \frac{2\gamma_{lv}\cos\theta}{r} \dots\dots\dots \text{equação 2.1}$$

Onde θ = ângulo de contacto, γ_{lv} = a tensão da interface líquido-vapor e r = raio do poro cilíndrico. Deste modo se o ângulo de contacto entre a superfície porosa e o líquido for maior que 90° , Δp é igual a zero e o líquido não é absorvido por capilaridade [13].

A)



B)

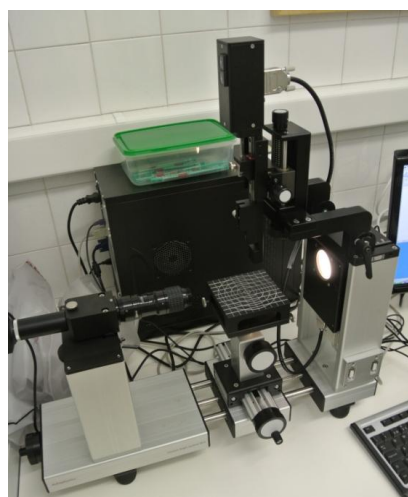


Figura 2.2 - A) Esquematisação da medição do ângulo de contacto (adaptado de [49]); B) Equipamento OCA 20 da Data Physics.

O método da gota séssil é usado para caracterizar superfícies sólidas e consiste em depositar uma gota de líquido com uma tensão superficial conhecida sobre uma superfície. A forma da gota, especificamente, o ângulo de contacto e a tensão superficial do líquido permitem calcular a tensão superficial da superfície do sólido. O equipamento capta a forma da gota através de um sistema de vídeo integrado e calcula automaticamente o ângulo de contacto [50].

Todas as medidas de ângulo de contacto foram efetuadas no equipamento OCA 20 da Data Physics (Figura 2.2). Cortaram-se quadrados de cada amostra de papel (10 x 10 mm) que foram colocados no equipamento. O fluxómetro foi ajustado para depositar 2 μL de água destilada sobre a superfície do papel. A forma das gotas foi registada pela câmara integrada no equipamento e através do *software* do aparelho calcularam-se os ângulos de contacto.

2.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica de análise química baseada em medições dos estados de vibração de uma molécula excitada por radiação infravermelha.

A região infravermelha ($10 - 14000 \text{ cm}^{-1}$) do espectro eletromagnético está dividida em três sub-regiões: próxima, média e longínqua. A região média ($400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$) é a mais usada em análise, uma vez que todas as moléculas possuem frequência de absorção características e vibrações moleculares primárias nesta gama de números de onda. A espectroscopia de infravermelho baseia-se em estudar a interação entre a radiação infravermelha e as amostras. Quando um feixe de radiação infravermelha passa por um material, são absorvidos comprimentos de onda específicos, causando vibrações nas ligações entre os átomos. Os grupos funcionais das moléculas tendem a absorver radiação no mesmo número de onda, independentemente das outras estruturas presentes na molécula e os picos espectrais são derivados a partir da absorção de variações de energia nos estados vibracionais das moléculas. Deste modo existe uma relação entre a posição das bandas as estruturas químicas na molécula. Um espectro infravermelho é obtido calculando a intensidade da radiação infravermelha antes e depois da interação com a matéria. O espectro é disposto num gráfico em que o eixo y representa unidades de absorvância ou transmitância em função do número de onda (eixo x). O espectro FTIR de absorvância segue a lei de Lambert-Beer, que relaciona concentração e absorvância através da equação 1.2.

A transmitância não é diretamente proporcional à concentração e é definida pela equação:

$$\%T = \frac{I_s}{I_R} \dots\dots\dots \text{equação 2.2}$$

Onde I_s = Intensidade do feixe depois de passar pela amostra e I_R = intensidade do feixe incidente [51], [52].

O acessório de ATR (*Attenuated Total Reflectance*) mede as diferenças que ocorrem num feixe de raios infravermelhos totalmente refletido quando o feixe inicial entra em contacto com a amostra. Quando a amostra se revela inapropriada para medição da transmitância, por exemplo por ser opaca, esta configuração é utilizada para medir a refletância. O feixe infravermelho é direcionado através do cristal e, devido à alteração do índice de refração na sua superfície, o feixe é refletido para trás em vários pontos ao longo do comprimento do cristal, até finalmente sair para o detetor (Figura 2.3 A). Quando a amostra é colocada em contacto com a superfície do cristal, o feixe vai interagir com a amostra em diversos pontos [63].

Foi utilizado o equipamento Nicolet 6700 FT-IR da Thermo Electron Corporation (Figura 2.3 B) com acessório ATR de cristal de diamante para obter os espectros de infravermelho das amostras de papel e cera.

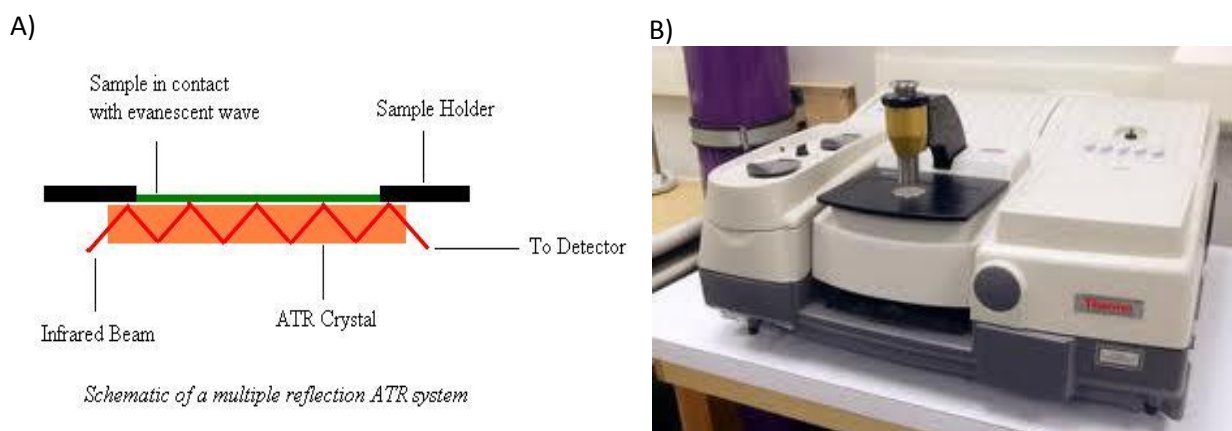


Figura 2.3 - A) Representação do princípio físico do módulo ATR. B) Equipamento Nicolet 6700 FT-IR da Thermo Electron Corporation, presente no CENIMAT/I3N.

2.4 Análise térmica

Um dos testes mais simples que se pode efetuar a uma amostra de um determinado material em estudo é aquece-lo. A observação do comportamento da amostra e a quantificação das mudanças durante o aquecimento pode fornecer informação importante acerca da natureza do material. O termo análise térmica (TA - do inglês *Thermal Analysis*) é frequentemente usado para descrever técnicas experimentais capazes de avaliar o comportamento de uma amostra em função da temperatura como a calorimetria diferencial de varrimento (DSC - do inglês *Differential Scanning Calorimetry*), análise térmica diferencial (DTA - do inglês *Differential Thermal Analysis*), termogravimetria (TG) e análise termomecânica (TMA - do inglês *Thermomechanical Analysis*) [53]. Na Figura 2.4 pode observar-se uma comparação entre curvas resultantes de análise termogravimétrica e calorimetria diferencial de varrimento correspondentes a uma variedade de processos físico-químicos, bem como o equipamento usado para todas as caracterizações térmicas efetuadas.

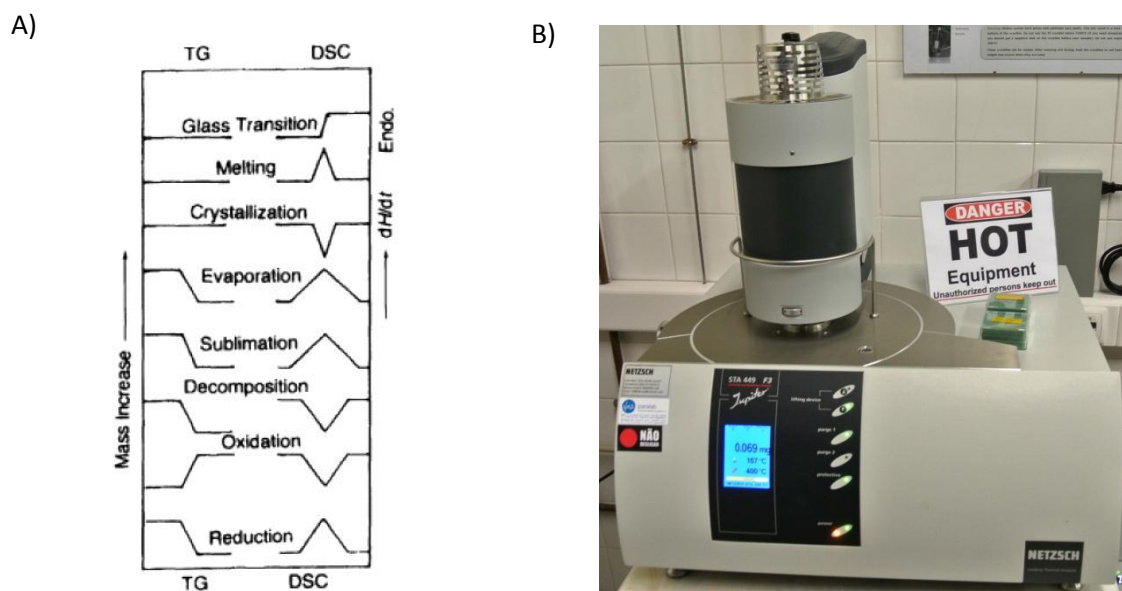


Figura 2.4 - A) Comparação de curvas esquemáticas de TG e DSC para uma variedade de processos físicoquímicos [53]; B) Equipamento STA 449 F3 Jupiter da NETZSCH.

2.4.1 Termogravimetria

A análise termogravimétrica (TG) é uma técnica baseada no registo da variação da massa de uma amostra de um determinado material em função da temperatura ou do tempo. É usada para caracterizar a decomposição e estabilidade térmica de materiais e para analisar a cinética dos processos físico-químicos ocorrentes na amostra. Fatores como a massa, volume, forma física da amostra e pressão atmosférica da câmara podem afetar as características da perda de massa de um material. Deste modo, estabelecer condições ótimas para a análise termogravimétrica requer normalmente testes preliminares. Os resultados desta análise são dispostos num gráfico com a variação de massa (Δm) expressa em percentagem no eixo vertical e temperatura ou tempo no eixo horizontal. A análise é caracterizada por duas temperaturas, T_i que representa a temperatura mais baixa a que uma variação de massa pode ser detetada, e T_f que é a menor temperatura para a qual o

processo responsável pela perda de massa se completa. Estes valores não têm significância absoluta e o intervalo da reação ($T_i - T_f$) depende das condições experimentais [53].

A análise termogravimétrica é efetuada numa termobalança. Este aparelho é constituído por uma microbalança eletrónica, um forno, um programador de temperatura e um instrumento para gravação dos dados produzidos por estes componentes.

Como muitas outras técnicas experimentais, a análise TG não fornece resultados inequívocos para todos os fenómenos físico-químicos que ocorrem durante o processo de degradação, pelo que é comum o cruzamento com dados de outras técnicas experimentais. O equipamento usado para esta análise permite simultaneamente análise por Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC).

2.4.2 Calorimetria diferencial de varrimento

A técnica DSC mede as variações de energia que ocorrem quando uma amostra é aquecida, arrefecida ou mantida a temperatura constante. Essas variações de energia permitem encontrar e quantificar as transições que ocorrem na amostra bem como a temperatura a que ocorrem. É assim possível determinar temperaturas de fusão e cristalização e transições mesomorfas.

Quando uma amostra sofre uma transformação física como uma mudança de fase, esta absorve mais ou menos calor relativamente à referência, para que permaneçam as duas à mesma temperatura. A quantidade de calor absorvida pela amostra depende da natureza do processo inerente à mudança de fase (endotérmico ou exotérmico). Por exemplo, à medida que uma amostra sólida se funde num líquido necessita de um maior fluxo de calor para manter a taxa de aquecimento da referência, uma vez que esta transição de fase é endotérmica. Do mesmo modo, quando uma amostra sofre uma transição exotérmica como a cristalização, requer um fluxo de calor menor. Observando as diferenças no fluxo de calor entre a amostra e a referência, o calorímetro diferencial de varrimento conseguem medir a quantidade de calor absorvido ou libertado durante as transições referidas [53–55].

A análise térmica das amostras de papel foi efetuada em cadinhos de alumínio e em atmosfera de ar. O intervalo de temperaturas usado foi de 20 a 550 °C, com uma taxa de aquecimento de 5 °C/minuto. A análise térmica da cera de impressão foi feita entre as temperaturas de 20 e 400 °C, também com uma taxa de 5 °C/minuto.

Capítulo 3

Procedimento e materiais

Neste capítulo são descritos todos os procedimentos experimentais e materiais usados durante o trabalho.

3.1 Preparação dos substratos

O substrato *Whatman Celulose Chromatography Paper Grade 1* (Whatman Internacional Ltd., Florham Park, NJ, USA) foi adquirido em folhas de 460 x 570 mm, e cortado em formato A5 (148 x 210 mm), que pode ser diretamente colocado na impressora. Os papéis de impressão, branco e reciclado (Cópia 2000, Steinbeis Papier, Gluckstadt, Germany), foram adquiridos em formato A4. Este formato é adequado para o tabuleiro da impressora e como tal, estas amostras não sofreram nenhuma alteração antes de serem utilizadas. O papel de filtro de café (Silvex, Benavente, Portugal) por não possuir um formato adequado para impressão, foi fixado a uma folha de formato A5 com fita-cola e só depois colocado no tabuleiro de impressão.

3.2 Método de produção: impressão a cera

O fabrico de plataformas de microfluídica em substratos celulósicos pelo método de impressão a cera engloba três passos principais:

- Desenhar o padrão desejado;
- Depositar a cera na superfície do substrato;
- Difundir da cera por toda a espessura do papel.

As microplacas e restantes dispositivos necessários ao longo do trabalho, foram desenhados no *software Adobe Illustrator* (Adobe Systems Incorporated, California, USA)

Neste trabalho foi usada uma impressora Xerox ColorQube 8570 (Xerox Corporation, Norwalk, CT, USA) para depositar camadas de material hidrofóbico sobre o substrato. Neste equipamento o reservatório de tinta é um bloco sólido de cera que funde a baixas temperaturas. Usando esta impressora, foi possível criar padrões complexos, bem como reproduzi-los e alterá-los com facilidade. As definições da impressora foram ajustadas de modo a ser depositada a máxima

quantidade de cera possível. As definições utilizadas podem ser observadas no Anexo 1 - Definições da impressora

Para difundir a cera e criar as barreiras hidrofóbicas foi usada uma placa de aquecimento (Heidolph MR Hei-Tec, Schwabach, Germany), uma vez que proporciona uma superfície lisa a uma temperatura constante, permitindo um aquecimento uniforme dos dispositivos. O processo de fabrico de dispositivos de microfluídica em papel, nomeadamente uma microplaca de 24 poços, encontra-se representado na Figura 3.1.

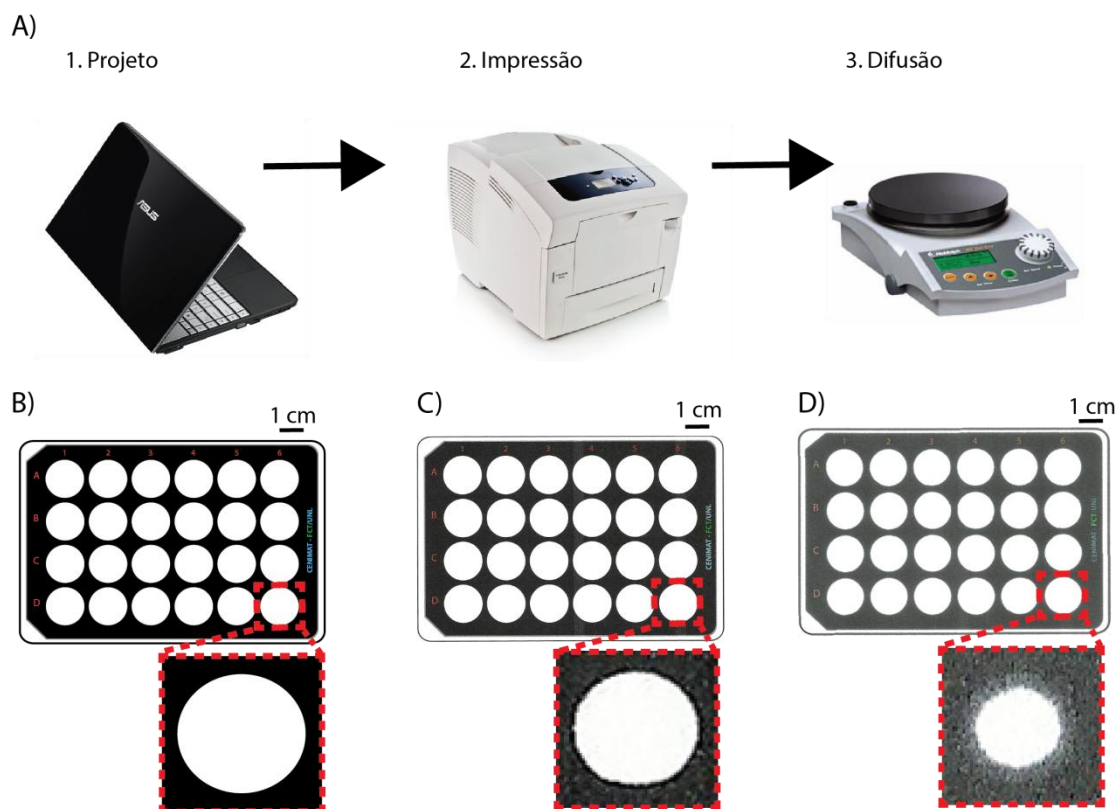


Figura 3.1 A) Fluxograma do processo de impressão a cera; B) desenho da microplaca; digitalização da microplaca de papel após: C) impressão e D) difusão.

3.2.1 Modelos de difusão da cera em papel de cromatografia Whatman Nº1

O baixo ponto de fusão da cera permite a criação de barreiras hidrofóbicas, no entanto a difusão lateral da cera altera as dimensões finais dos dispositivos. Deste modo processo de difusão foi estudado para fornecer modelos que permitam prever o seu comportamento e, consequentemente as dimensões finais dos dispositivos.

Na Tabela 3.1 estão enunciadas as temperaturas e tempos de aquecimento usados para estudar o processo de difusão. Para abreviar as condições do processo de aquecimento a que cada conjunto de linhas ou poços foi submetido, foi-lhes atribuído um número de 1 a 8 que indica o tempo e temperatura do processo de aquecimento (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Temperaturas e tempos de aquecimento de cada série

Nº da Série	Temperatura (°C)	Tempo (segundos)
1	80	60
2	80	120
3	100	60
4	100	120
5	120	60
6	120	120
7	140	60
8	140	120

3.2.1.1 Barreiras em formato linha

Desenhou-se um conjunto de linhas de largura nominal (L_n) entre 100 e 700 μm , em incrementos de 100 μm . Imprimiram-se oito repetições do conjunto de linhas e cada um foi submetido a uma combinação de temperatura / tempo de aquecimento diferente, de acordo com a Tabela 3.1. As linhas foram fotografadas no microscópio ótico Olympus BX51 (Olympus Corporation, Tokyo, Japão) após impressão, passaram pela fase de aquecimento e foram fotografadas de novo no mesmo equipamento. O *software* do equipamento permite imprimir uma barra de escala digital nas imagens que foi posteriormente usada para efetuar as medições.

Todas as medidas efetuadas nas imagens digitais foram feitas no programa Image J (National Institutes of Health, USA). O *software* conta o número de pixels numa determinada linha ou área indicada pelo utilizador e converte automaticamente as medições de acordo com a escala imprimida no microscópio ótico. Para cada largura nominal foram medidos os seguintes parâmetros ($n = 5$):

- L_{inicial} : Largura de uma linha impressa;
- L_{barreira} : Largura de uma barreira, ou seja, uma linha impressa e aquecida;

A largura de cada linha é a média de vinte medidas diferentes efetuadas ao longo de todo o seu comprimento (da parte da linha capturada na fotografia).

Na Figura 3.2 estão representados os parâmetros definidos:

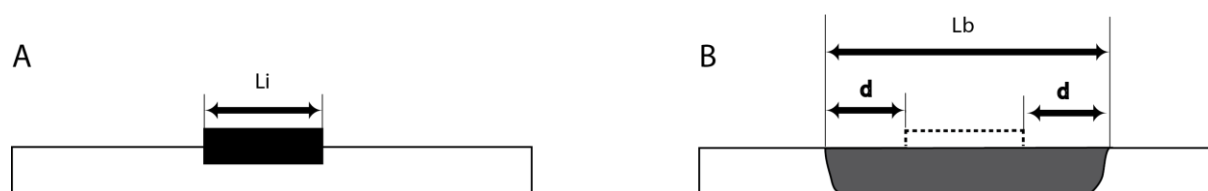


Figura 3.2 - Representação esquemática de uma secção de corte de: A) linha impressa; B) barreira hidrofóbica.

O parâmetro d ($n = 5$) foi calculado a partir dos dados experimentais de acordo com a expressão:

$$d_{\text{linhas}} = \frac{L_{\text{barreira}} - L_{\text{inicial}}}{2} \dots\dots\dots \text{equação 3.1}$$

3.2.1.2 Barreiras circulares (poços)

Um método semelhante ao aplicado no estudo anterior foi utilizado para quantificar a difusão em poços circulares, rodeados de cera. Imprimiram-se poços com diâmetros nominais (**Pn**) entre 2 e 20 mm, em incrementos de 2 mm. A gama de diâmetros usada foi ponderada de modo a incluir os diâmetros de poço das microplacas convencionais de 24, 96 e 385 poços. A escolha destas dimensões impossibilitou o uso do microscópio ótico para registar as imagens, uma vez que mesmo o poço mais pequeno excede as dimensões do campo de visão máximo permitido pelo equipamento.

Imprimiram-se oito séries de poços, que foram submetidos às mesmas condições de aquecimento das séries de linhas (Tabela 3.1). As séries de poços foram digitalizadas antes e após o processo de aquecimento. Todos os registos foram feitos num *scanner HP Deskjet 4580 (Hewlett Packard, Pablo Alto, California, USA)*, juntamente com uma barra de escala para calibração do *software*. As medidas foram feitas no programa Image J, e foram medidos os seguintes parâmetros (n = 8):

- **P_{inicial}** : Diâmetro de um poço impresso;
- **P_{barreira}**: Diâmetro de uma barreira, ou seja, um poço impresso e aquecido;

Para aumentar o rigor das medidas, o valor do diâmetro de um determinado poço é a média aritmética de quatro medições diferentes.

Os parâmetros definidos para este estudo estão representados na Figura 3.3.

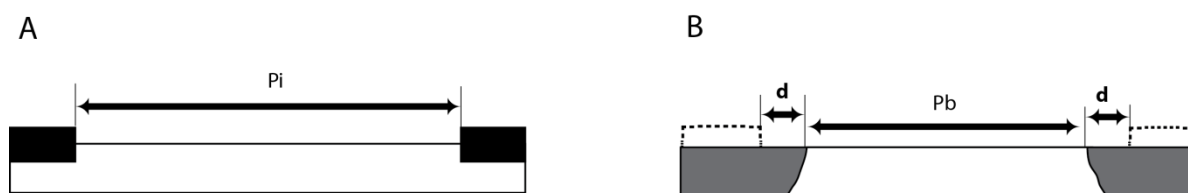


Figura 3.3- Representação esquemática de uma secção de corte de: A) poço impresso; B) barreira hidrofóbica

De forma similar ao que foi descrito anteriormente o valor da difusão lateral d (n = 8) foi calculado experimentalmente através da expressão:

$$d_{\text{poços}} = \frac{P_{\text{barreira}} - P_{\text{inicial}}}{2} \dots\dots\dots \text{equação 3.2}$$

3.2.2 Resolução funcional do método

Depois de quantificar o processo de difusão, foi necessário avaliar a resolução funcional do método, ou seja, as dimensões nominais mínimas necessárias para originar barreiras hidrofóbicas e zonas hidrófilas funcionais. Para conseguir determinar a eficácia das barreiras criadas usou-se uma solução aquosa de Amaranth Red (*Amaranth Red*, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) com uma concentração de 2,5 mM.

3.2.2.1 Barreiras hidrofóbicas

Define-se uma barreira hidrofóbica funcional, como uma barreira que delimita o fluxo de soluções no papel por capilaridade, retendo-as até estas secarem completamente.

Determinou-se experimentalmente a linha de menor largura nominal capaz de formar uma barreira hidrofóbica funcional para cada combinação temperatura/tempo. Desenharam-se barreiras retangulares compostas por duas linhas horizontais e duas linhas verticais ($n = 10$). Usaram-se linhas de largura entre 100 e 700 μm , em incrementos de 100 μm (Figura 3.4 A). Foram impressas oito séries idênticas à apresentada na figura sendo cada uma submetida a condições de aquecimento diferentes (Tabela 3.1). Para o segundo formato de barreira foram desenhados conjuntos de poços com diâmetro de 6 mm, dispostos de acordo com a Figura 3.4 B. Esta disposição visa simular a organização de poços numa microplaca de 96 poços. Cada zona de análise consiste num quadrado de 3x3 poços. No poço central são depositados 10 μL da solução aquosa de corante. Se o corante fluir para qualquer um dos poços vizinhos, considera-se que o poço não é funcional. Foram impressas oito séries diferentes do desenho e foram usadas as condições de aquecimento da Tabela 3.1.

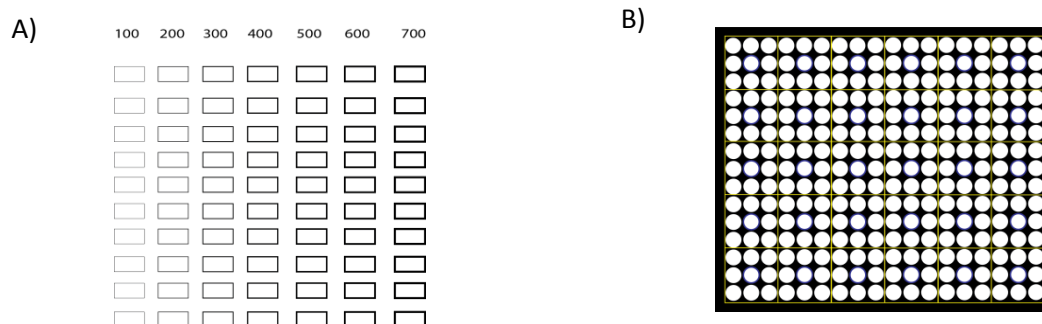


Figura 3.4 - Desenho dos esquemas usados para determinar a resolução de: A) barreiras em formato linha e B) poços.

3.2.2.2 Zonas hidrófilas

Definiu-se o menor canal hidrófilo funcional (zona entre duas barreiras hidrofóbicas funcionais), aquele com pelo menos 10 mm de comprimento permita a passagem da solução ao longo de todo o seu comprimento. O menor poço hidrófilo funcional tem que permitir a passagem da solução da frente para o verso da folha, ou seja, deve conservar zonas hidrófilas em toda a espessura do papel.

Para determinar a largura do menor canal hidrófilo funcional, fabricou-se um conjunto de canais ($n = 20$) com dimensões nominais entre 300 e 1500 μm , em incrementos de 100 μm . Foram usadas linhas de 400 μm que foram difundidas a 140 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 minuto, para criar as barreiras a delimitar os canais. Para determinar a dimensão do menor poço circular funcional, imprimiram-se poços com dimensões entre 0,5 e 1,5 mm, em incrementos de 0,5 mm ($n = 20$). Na Figura 3.5 podem observar-se os padrões produzidos para este estudo.

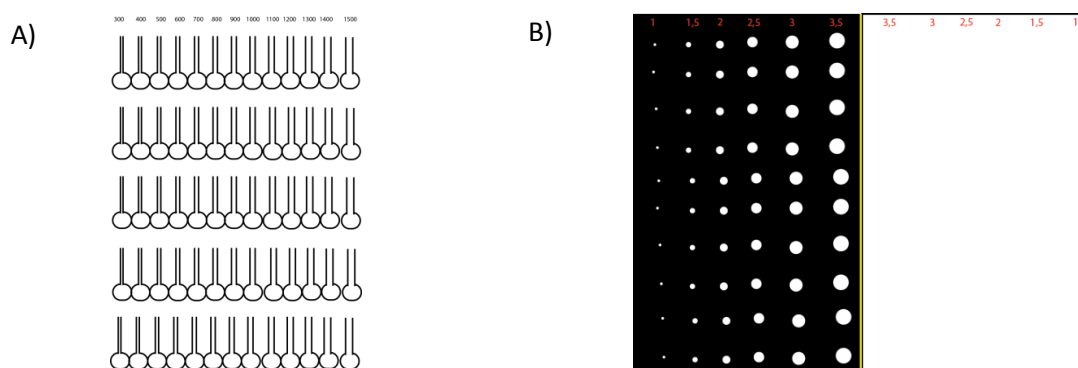


Figura 3.5 - Desenho dos padrões usados para determinar: A) o menor canal; B) o menor poço hidrófilo funcional.

3.3 Formatos desenvolvidos

As microplacas de papel foram desenhadas de modo a replicar as dimensões das placas plásticas tridimensionais de 24, 96 e 384 poços. A escolha destes formatos potencia o uso das microplacas de papel em sistemas automatizados de leitura e de deposição de reagentes já existentes.

As medidas de microplacas convencionais foram tiradas de "Microplate Dimensions Guide: Compendium of Greiner Bio-One Microplates" [56] (Figura 3.6).

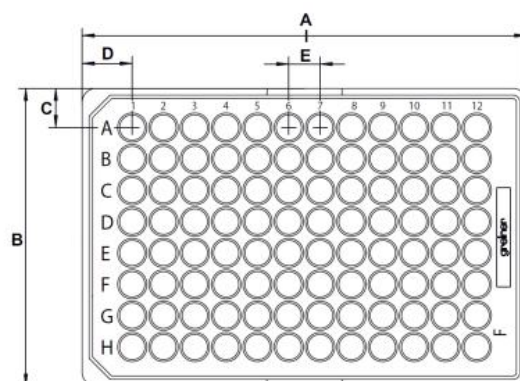


Figura 3.6 - Desenho técnico de uma microplaca de 96 poços [56]

Foram criados formatos de 24, 96 e 384 poços. As expressões obtidas no estudo da difusão da cera foram utilizadas para calcular as dimensões nominais de cada dispositivo de acordo com as medidas finais desejadas. De acordo com o estudo de difusão da cera, as microplacas foram desenhadas colocando a grelha de poços em cima de um fundo preto, alternativamente delimitou-se cada poço com uma barreira de largura nominal igual a 400 μm . O primeiro método permite aumentar a capacidade de retenção de cada poço e a operabilidade das microplacas, enquanto o método alternativo permite reduzir a quantidade de cera utilizada por cada microplaca.

De acordo com o formato foi desenhado o padrão correspondente em Adobe Illustrator (Figura 3.7).

24 poços

96 poços

384 poços

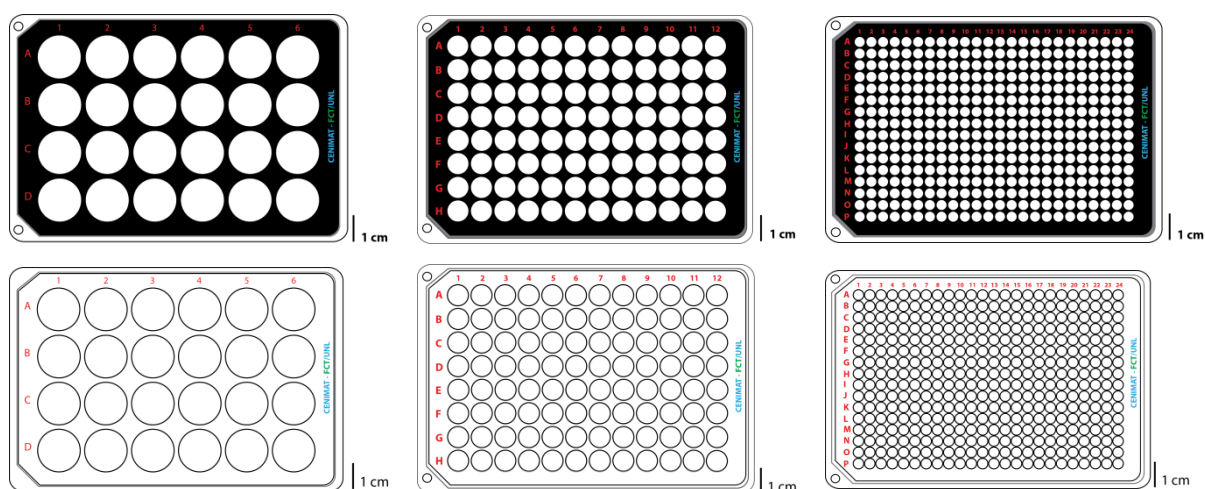


Figura 3.7 - Formatos de microplacas papel com dimensões standardizadas.

Os padrões desenhados em computador foram impressos e difundidos no papel de acordo com o procedimento esquematizado na Figura 3.8. Nos dispositivos em que não é necessário aceder aos poços pelo verso da microplaca foi impressa uma camada de encapsulamento, de modo a facilitar o seu manuseamento.

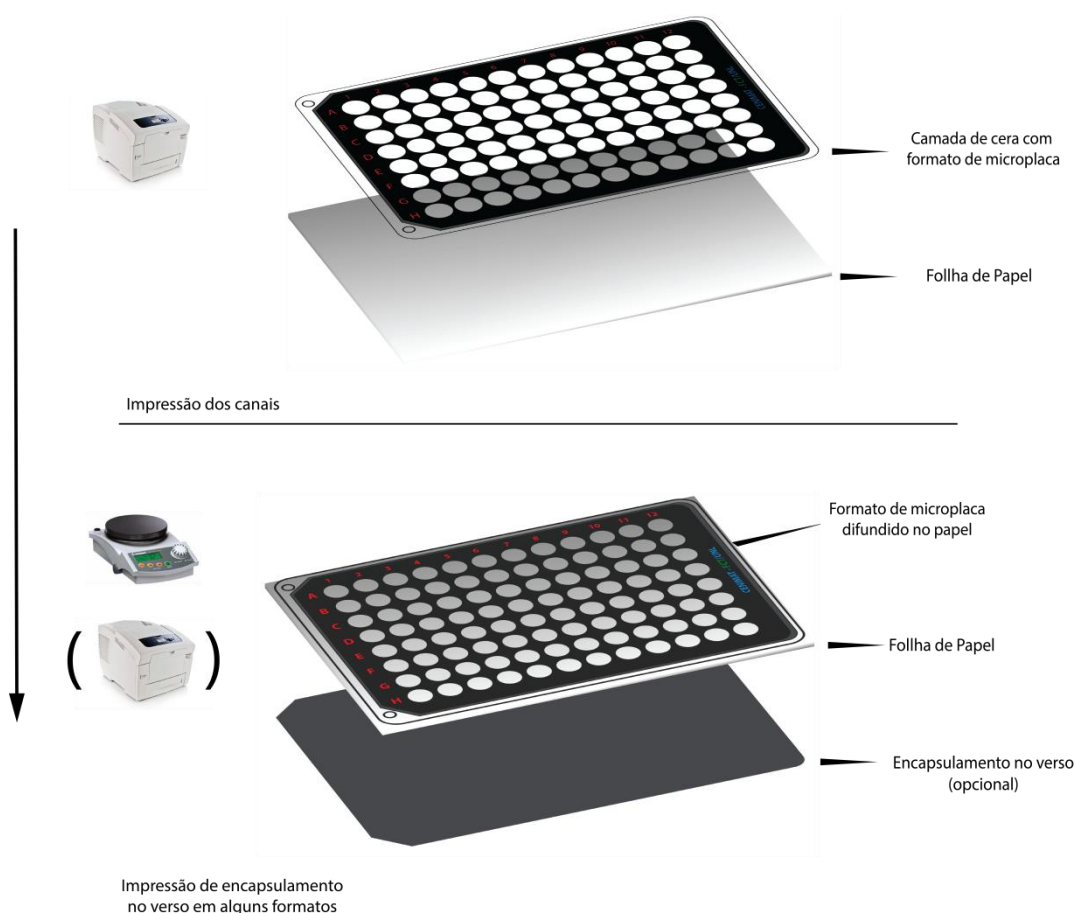


Figura 3.8 - Representação do processo de fabrico das microplacas.

3.4 Sistema de Leitura de Resultados

De modo a demonstrar o potencial das microplacas de papel como alternativa à microplacas convencionais, foi usado um sistema de detecção validado e presente na maioria de laboratórios de análise e clínicas. Os leitores de microplacas são espectrofotômetros automatizados, regularmente usados para medição de resultados de ensaios feitos em microplacas convencionais [10].

Como alternativa de baixo custo a este sistema de detecção demonstra-se que *scanners* comerciais e câmaras fotográficas podem ser usados como detetores de refletância para medir e quantificar diferenças colorimétricas nos ensaios realizados em microplacas de papel.

3.4.1 Preparação das soluções

Na Tabela 3.2 estão listadas as quantidades de corante por cada coluna e a concentração das soluções em microplaca de plástico e papel.

Tabela 3.2 -Quantidades de corante e concentração das soluções depositadas em microplaca de papel e plástico.

Coluna	Número de moles por zona (mole)	Concentração (mole/L)	
		Plástico (100 µL)	Papel (10 µL)
1	$2,5 \times 10^{-8}$	$2,5 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-3}$
2	$1,25 \times 10^{-8}$	$1,25 \times 10^{-4}$	$1,25 \times 10^{-3}$
3	$6,25 \times 10^{-9}$	$6,25 \times 10^{-5}$	$6,25 \times 10^{-4}$
4	$3,13 \times 10^{-9}$	$3,13 \times 10^{-5}$	$3,13 \times 10^{-4}$
5	$1,56 \times 10^{-9}$	$1,56 \times 10^{-5}$	$1,56 \times 10^{-4}$
6	$7,81 \times 10^{-10}$	$7,81 \times 10^{-6}$	$7,81 \times 10^{-5}$
7	$3,91 \times 10^{-10}$	$3,91 \times 10^{-6}$	$3,91 \times 10^{-5}$
8	$1,95 \times 10^{-10}$	$1,95 \times 10^{-7}$	$1,95 \times 10^{-6}$
9	$9,77 \times 10^{-11}$	$9,77 \times 10^{-8}$	$9,77 \times 10^{-7}$
10	$4,88 \times 10^{-11}$	$4,88 \times 10^{-8}$	$4,88 \times 10^{-7}$
11	$2,44 \times 10^{-11}$	$2,44 \times 10^{-8}$	$2,44 \times 10^{-7}$
12	0	0	0

O objetivo deste trabalho inicial é determinar a sensibilidade das microplacas de papel para medir e quantificar analitos usando leitores de microplacas e *scanners*. A plataforma foi testada usando dois corantes biológicos, Amarantho (*Amaranth Red*) e Azul Comassie (*Comassie Brilliant Blue G*, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Ambos os corantes foram adquiridos em pó, dos quais se fizeram soluções aquosas com concentração igual a 0,25 mM. De seguida foram depositados 200 µL de solução de cada corante na primeira coluna (quatro poços para cada corante) de uma microplaca de plástico com 96 poços (Nuclon®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Na coluna seguinte foram adicionados 100 µL de água destilada e 100 µL da solução do poço anterior. Este procedimento foi repetido ao longo de onze colunas da microplaca. Na última coluna foram depositados apenas 100 µL de água destilada (branco). As soluções e diluições utilizadas na microplaca de papel foram preparadas consoante o procedimento descrito usando soluções iniciais de ambos os corantes a 2,5 mM. Foram depositados 10 µL de solução em cada poço com coordenada correspondente de uma microplaca de papel com 96 poços.

3.4.2 Espectrofotometria de absorvância (leitor de microplacas)

As medições de absorvância foram efetuadas num leitor de microplacas Tecan Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suíça). Foram efetuadas medições em microplaca de plástico, na qual os corantes se encontravam em solução e em microplaca de papel. Na microplaca de papel os corantes encontravam-se em fase sólida, adsorvidos nas fibras de celulose, devido a um processo de secagem à temperatura ambiente durante 30 minutos. Para garantir que os poços da microplaca de papel ficassem corretamente posicionados dentro do leitor recorreu-se a um suporte plástico geralmente usado para suporte de poços individuais (Figura 3.9). As microplacas de papel foram fixadas ao suporte com fita aderente de dupla face e colocadas diretamente no leitor.

As medições de absorvância foram efetuadas numa gama de comprimentos de onda entre 400 e 800 nm, em intervalos de 1 nm.

Para análise dos resultados, os dados foram normalizados subtraindo o espectro do poço branco (no qual foi depositado apenas água destilada). De seguida foi calculada a área subjacente a cada espectro, e usou-se esse valor como a medida da absorvância de um determinado poço. (Anexo 3)

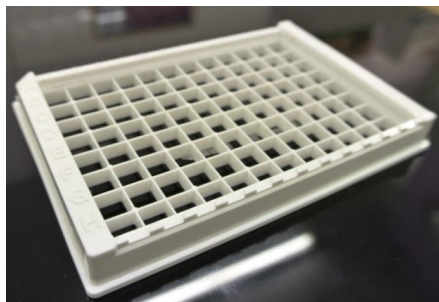


Figura 3.9 - Suporte usado para medições de absorvância nas microplacas de papel.

3.4.3 Medições de refletância (esfera integradora e imagens digitais)

Para obter os espectros de refletância dos corantes quando absorvidos pelas fibras do papel, foi usado um espectrofotómetro com esfera integradora (Shimadzu UV 3101pc e ISR-260 *Integrating Sphere Attachment*, Shimadzu Corporation, Japan). Em dois poços de papel com 10 mm de diâmetro foram depositados 20 µL das soluções de ambos os corantes a 2,5 mM. Os poços secaram à temperatura ambiente durante 30 minutos e colocadas diretamente no espectrofotómetro.

As microplacas de papel analisadas no leitor de microplacas foram previamente digitalizadas no *scanner* (digitalização a cores, 300 dpi) e fotografadas com a câmara fotográfica Nikon 1 J1 de 10 mega pixéis (3872 x 2592) (Nikon Corporation, Japan)

Para análise dos resultados as imagens foram introduzidas no programa Image J. Com a ferramenta de seleção foi desenhado um círculo de modo a conter toda a área de um poço e foi registada a média dos valores RGB dos pixéis contidos na área selecionada. Os valores obtidos para cada poço foram invertidos, subtraindo cada valor ao máximo da escala, e normalizados a zero, subtraindo o valor médios dos poços brancos.

3.5 Dispositivos de diagnóstico

3.5.1 Procedimento ELISA para diagnóstico de leishmaniose canina

Nas microplacas de papel com 96 poços produzidas anteriormente, foi implementado um ensaio ELISA para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*.

3.5.1.1 Preparação de reagentes

O antígeno usado é um extrato de promastigotas de uma estirpe de referência de *Leishmania infantum*, cuja cultura é mantida no INIAV IP (Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária). Os parasitas são recolhidos da cultura (20 ml) por centrifugação (1000 g durante 20 minutos) e lavados três vezes com PBS (pH 7,2). O produto resultante é ressuscitado em água (1.5 ml), sonificado e centrifugado durante 30 minutos a 10000 g. O sobrenadante é recolhido e a sua concentração é determinada por espectrofotometria (*NanoDrop 2000, Thermo Scientific*). A concentração de antígeno é ajustada por diluição para 1 µg/µL. O antígeno e as soluções enunciadas a seguir foram fornecidos pelo INIAV IP e utilizadas diretamente no procedimento:

- PBS 1x;
- Solução de Bloqueio (0,05% (v/v) Tween-20, 1% (p/v) BSA em PBS);
- Tampão de incubação (0,05% (v/v) Tween-20 em PBS);
- Diluição para substrato da fosfatase alcalina (0,1 M Tris-HCl (pH 9,5), 0,1 M NaCl, 0,05 M MgCl₂);
- Soro positivo (com anticorpos anti-*Leishmania*) e negativo (sem anticorpos anti-*Leishmania*).

3.5.1.2 Realização dos ensaios

Para execução do teste, em microplaca de papel com 96 poços, adicionaram-se 5 µL da solução de antígeno a cada zona de teste, seguindo-se um período de secagem de 30 minutos à temperatura ambiente. Adicionaram-se 5 µL da solução de bloqueio a cada zona e seguiram-se mais 30 minutos de secagem. A cada zona de teste adicionaram-se 5 µL de amostra de soro (diluição 1:10 (v/v) em PBS), que incubou durante 15 minutos. As zonas de teste foram lavadas duas vezes pela adição de 10 µL de PBS, depositando o PBS diretamente no poço e removendo o excesso por meio de papel absorvente pelo verso da microplaca. Seguidamente adicionaram-se 5 µL do anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) em tampão de incubação (diluição 1:1000 (v/v)). Após 10 minutos de incubação procedeu-se a uma nova lavagem com PBS (2x10 µL) e foram adicionados a cada poço 5 µL da solução de substrato da fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) diluída na solução indicada acima. Seguiu-se um período de incubação de 20 minutos à temperatura ambiente e posterior registo e análise.

3.5.1.3 Aquisição e análise de dados

As placas onde foram realizados ensaios foram digitalizadas no *scanner* a 300 dpi. As imagens digitais foram introduzidas no programa Image J. Com a ferramenta de seleção foi desenhado um

círculo de modo a conter toda a área de um poço e foi registada a média dos valores RGB dos pixéis contidos na área selecionada.

3.5.2 Plataforma de papel para deteção de tuberculose com nano partículas de ouro [37]

3.5.2.1 Preparação da plataforma

Esta aplicação foi desenvolvida em microplacas de papel no formato de 384 poços desenvolvido anteriormente. Cada poço foi impregnado com 1 μ L de solução de Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$) a 0,12 M, e deixado a secar à temperatura ambiente durante 10 minutos. As microplacas foram armazenadas a 25 °C, embrulhadas em papel de alumínio até serem utilizadas.

3.5.2.2 Preparação da amostra de DNA

Um processo de PCR (Polymerase Chain Reaction) específico foi usado para amplificar um fragmento com 395 pares de bases da subunidade beta da polimerase de RNA de *M. tuberculosis* (*rpoB*-GenBank accession no. L27989), gene apropriado para deteção de membros de MTBC por meio de nanopartículas de ouro [57], [58]. A amplificação PCR foi feita num volume final de 50 μ L, contendo 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 8.3), 2.2 mM de $MgCl_2$, 200 mM de cada dNTP, e 1 U de *Taq DNA* polimerase (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Europe, GmbH), 10 pmol de cada primer (P1 5'-GAG AAT TCG GTC GGC GAG CTG ATC C-3'; P2 5'-CGA AGC TTG ACC CGC GCG TAC ACC-3') envolvendo 35 ciclos de 45 segundos de desnaturação a 94 °C, 45 segundos de *annealing* a 58 °C, seguidos de 45 segundos de extensão a 72 °C. A amplificação foi observada por eletroforese em gel de Agarose (1%), e confirmada por sequenciação direta usando a tecnologia Big Dye v3.1 (STABVIDA, Almada, Portugal). As amostras de DNA isoladas de *M. tuberculosis* foram usadas como amostras positivas (complementar de MTBC). As amostras negativas (não-complementar de MTBC) foram isoladas de culturas de *Mycobacterium kansasii*, cuja sequência difere em apenas um nucleótido da sequência alvo de *M.tuberculosis rpoB*.

3.5.2.3 Síntese e caracterização das nanossondas

Nano partículas de ouro com tamanho médio de 14 nm foram sintetizadas pelo método de redução de citrato, descrito por Lee e Meisel [59]. Aqueceram-se 250 mL de $HAuCl_4$ a 1 mM, mexendo a solução ao longo do aquecimento. Adicionaram-se 25 mL de citrato de sódio a 28,8 mM, misturou-se durante 15 minutos e deixou-se a solução arrefecer à temperatura ambiente. As nanossondas foram preparadas incubando os oligonucleótidos modificados com tiol com as AuNPs durante 16 horas. A solução foi lavada com tampão fosfato (10 mM, pH = 8), e a concentração de sal foi aumentada de modo a reduzir ligações inespecíficas entre os oligonucleotidos modificados e as AuNPs. A solução foi centrifugada e ressuspendeu-se o sobrenadante em tampão fosfato 10 mM (pH 8)), 0,1 M NaCl. O produto final foi armazenado a 4°C num local escuro até ser utilizado. A especificidade das sondas foi testada em silício usando as ferramentas BLAST do GenBank. Posteriormente a sonda MTBC 5'-thiol-GAT CGC CTC CAC GTC C-3' (STABVIDA, Portugal), foi usada para funcionalizar as AuNPs [57], [60] .

3.5.2.4 Ensaio colorimétrico com nanossondas de ouro

Os produtos do PCR foram precipitados em etanol, ressuspensos em água destilada e usados no ensaio colorimétrico. Cada ensaio colorimétrico foi realizado num volume de 30 μL , com uma concentração de nanossondas 2,5 mM em tampão fosfato a 10 mM (pH = 8), 0,1 M de NaCl, e DNA alvo com a concentração final de 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O ensaio envolve a comparação visual de uma amostra de tampão fosfato a 10 mM (pH = 8) sem DNA, que consiste no valor de referência ou "branco", com as restantes amostras. Depois de 10 minutos a 95 °C para desnaturação do DNA alvo, as misturas repousaram durante 30 minutos à temperatura ambiente e foi adicionado cloreto de magnésio (MgCl_2) a 0,02 M. Depois de 30 minutos à temperatura ambiente para desenvolvimento da cor, as misturas e o branco foram analisados por espectroscopia visível/UV num leitor de microplacas (Tecan Infinite M200).

Na plataforma *Gold on paper* usou-se um volume total de 5 μL com 2,5 nM de nanossondas de ouro em 10 mM de tampão fosfato (pH = 8), 0,1 M de NaCl e DNA alvo com concentração final de 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Depois de 10 minutos de desnaturação a 95 °C, as misturas repousaram 10 minutos à temperatura ambiente e depositadas na microplaca de papel. Depois de 45 minutos para desenvolvimento da cor a microplaca foi fotografada com um telemóvel.

3.5.2.5 Aquisição e análise de dados

As variações de cor foram registadas por um *smarthphone* HTC *Desire Android* com uma câmara fotográfica de 5 megapixéis (2592 x 1944 pixéis) com autofoco. Todas as fotos foram tiradas com luz branca artificial sem *flash*. Os dados foram normalizados para as condições luminosas, usando os pontos de teste brancos contendo 10 mM de tampão fosfato (pH = 8). Os dados digitalizados foram analisados sem qualquer manipulação por uma aplicação de análise RGB (*ColorPikr*, *WiseClue*) e transmitidos por rede 3G para um computador para processamento com Image J. Cada ensaio foi repetido pelo menos três vezes em quatro microplacas diferentes.

Através de uma análise de variância ANOVA, com teste Tukey de comparação de médias, usando Prism 5 GraphPad (San Diego, CA), validaram-se os resultados. A análise one-way de variância foi usada para testar diferenças entre dois grupos de dados (Branco, amostra com MTBC, amostra sem MTBC e amostra não relacionada).

Capítulo 4

Apresentação e discussão de resultados

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos, considerações e conclusões das experiências efetuadas ao longo do trabalho. Em primeiro lugar são apresentados os dados da caracterização dos substratos e do material de impressão e resultantes conclusões. De seguida é apresentada a otimização do processo de fabrico das microplacas, a resolução funcional deste método e os dispositivos desenvolvidos. Para leitura de resultados de ensaios realizados em microplaca de papel demonstra-se que estes dispositivos são compatíveis com leitores de microplacas e é feito um estudo inicial na perspetiva de desenvolver um sistema alternativo de baixo custo. Finalmente apresentam-se os resultados obtidos nas provas de conceito de aplicação desta tecnologia a diagnóstico clínico.

4.1 Caracterização dos papéis e cera de impressão

O papel tem um longo registo de uso em laboratórios de bioquímica como suporte para filtração e cromatografia, sendo materiais maioritariamente celulósicos. Por outro lado papéis usados para embrulho, escrita, embalagens (cartão), limpeza (lenços) e outros, são materiais complexos, com uma elevada variedade de porosidades, tratamentos superficiais e aditivos adicionados durante a sua produção. Na perspetiva do trabalho, que usa o papel como suporte para reações de reconhecimento de agentes patogénicos, as propriedades deste material (química superficial, porosidade, propriedades óticas, etc.) são de extrema importância. A química superficial influencia a imobilização de biomoléculas, interações não específicas e expressão colorimétrica em ensaios com revelação enzimática. A porosidade, juntamente com a química de superfície influencia o ângulo de contacto e as propriedades óticas podem influenciar a revelação de resultados colorimétricos [16].

O papel de cromatografia Whatman nº 1 apresenta um considerável número de registos em aplicações de microfluídica em papel [10], [61–63]. No entanto, devido ao seu custo elevado face a outros tipos de papel, foram consideradas outras alternativas mais económicas. Deste modo foram analisados e caracterizados quatro tipos diferentes de papel (Figura 4.1):

- Papel de Cromatografia Whatman nº1, Whatman™ Papers (papel **W**)
- Papel de filtro de Café, Silvex (papel **C**)

- Papel de Impressão Branco, Cópia 2000® (papel B)
- Papel de Impressão Reciclado, Cópia 2000® (papel R)

Na Tabela 4.1 encontram-se algumas propriedades dos papéis testados.

Tabela 4.1 - Propriedades macroscópicas dos papéis testados (adaptado de [64])

Papel	Gramagem (g/m ²)	Espessura (μm)	Densidade (kg/m ³)	Porosidade (%)	Custo (€/m ²)
W	88	180	489	68,2	5,99
C	51	125	408	77,5	1,30
B	80	104	769	---	0,13
R	80	104	769	---	0,13

A gramagem (massa de papel seco por metro quadrado) e a espessura são duas propriedades macroscópicas regularmente usadas para caracterizar este tipo de material. Dividindo a gramagem do papel pela espessura obtemos a sua densidade. A porosidade do papel também está relacionada com estas propriedades pois resulta de espaços entre as fibras, lúmens de fibras não colapsados e porosidade intrínseca das fibras. Deste modo quando maior a densidade de um determinado papel menos espaços existem entre as suas fibras e menor é a sua porosidade. Por outro lado a densidade e espessura do papel afetam as suas propriedades óticas como opacidade e brilho, que se revelam cruciais na revelação de ensaios colorimétricos realizados em papel.

A cera de impressão é um material sólido à temperatura ambiente, que é fornecido em blocos moldados especificamente para o reservatório da impressora. Este material é constituído à base de cera de parafina e resinas de poliamida e terpeno [65]. A impressora usa quatro blocos de cera de cor diferente, de acordo com o sistema de cores CYMB (*Cyan, Yellow, Magenta, Black*). O bloco sólido pode ser usado como um lápis de cera, como se pode observar na Figura 4.1.

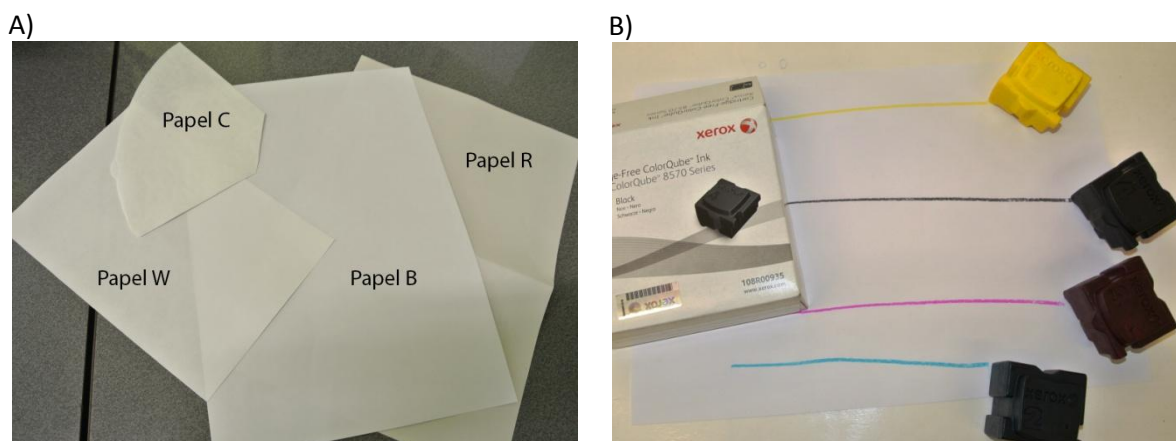


Figura 4.1 - A) Papéis testados; B) blocos de cera sólida Xerox.

4.1.1 Microscopia eletrônica de varrimento e espectroscopia dispersiva de raios-X

4.1.1.1 Substratos

A microscopia eletrônica de varrimento permite observar detalhadamente a morfologia superficial das amostras em estudo, neste caso papel. O papel, como foi definido no início do trabalho, é um material feito de uma rede de fibras de celulose, depositadas a partir de uma suspensão aquosa. As fibras de celulose têm forma de tubos cilíndricos com diâmetro médio de 20 μm e, devido ao processo de fabrico encontram-se orientadas maioritariamente no eixo horizontal. A deposição de fibras de celulose cria uma rede com algumas dezenas de fibras de espessura com fibras e espaços vazios superficiais e interiores.

Na Figura 4.2 são apresentadas duas imagens SEM de uma amostra de papel W, com ampliações de 100 e 1000x.

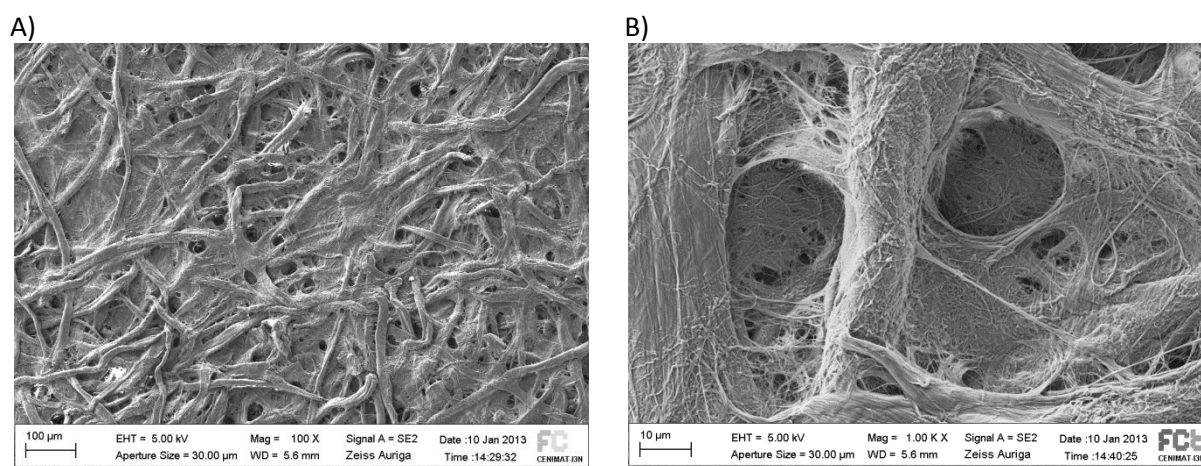


Figura 4.2 - Imagem de SEM de uma amostra de papel W ampliada: A) 100x e B) 1000x.

A imagem de ampliação 100x permite observar a rede de fibras dispostas no plano horizontal que constitui a folha de papel. Esta imagem revela também a presença de poros superficiais, o que se traduz num baixo ângulo de contacto e elevada capacidade de absorção. Entre as fibras maiores estão presentes alguns aglomerados de fibras mais pequenas, como se pode verificar pela imagem de ampliação 1000x. Esta morfologia apenas foi observada na amostra de papel W, indicando que é característica de fibras de celulose originárias de algodão.

A análise por espectroscopia dispersiva de raios-X (EDS) permite identificar os elementos químicos presentes na amostra. Utilizando o feixe de eletrões para excitar a amostra, é emitida radiação eletromagnética que é específica para cada elemento químico. Na Figura 4.3 está representado o espectro cumulativo da análise EDS efetuada ao papel W.

Analisando o espectro, verifica-se que os dois picos de maior intensidade ocorrem para as energias de 0,26 e 0,52 keV e correspondem aos elementos carbono e oxigénio, respetivamente. Os restantes picos identificados, ouro e paládio, ocorrem para as energias 2,14 e 2,84 keV respetivamente. Estes dois elementos são comuns a todas as amostras analisadas, uma vez que correspondem à camada de revestimento com a liga de ouro-paládio, com espessura de 10 nm. De

referir que o primeiro pico do espectro (para $E = 0$ keV) é característico do equipamento e também é comum a todas as amostras, não representando a presença de nenhum elemento.

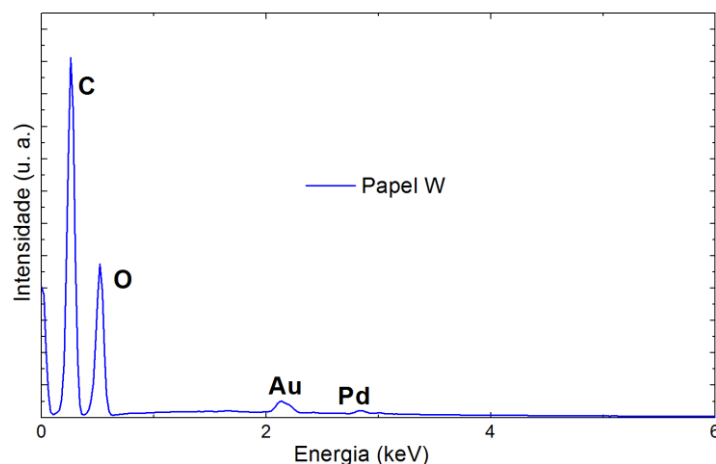


Figura 4.3 - Espectro EDS da amostra de papel W

Além do espectro cumulativo, a análise EDS fornece um mapa de distribuição dos diferentes elementos na amostra. Os mapas são obtidos através de milhares de varrimentos do feixe de elétrons na área limitada pela imagem apresentada. Quando os detetores sinalizam a presença de um determinado elemento, o *software* do equipamento acrescenta um pixel branco na zona correspondente da área delimitada pela imagem. Posteriormente foi adicionada coloração artificial a alguns mapas, de modo a facilitar a sua leitura. A Figura 4.4 apresenta os mapas de distribuição dos elementos químicos encontrados no papel W.

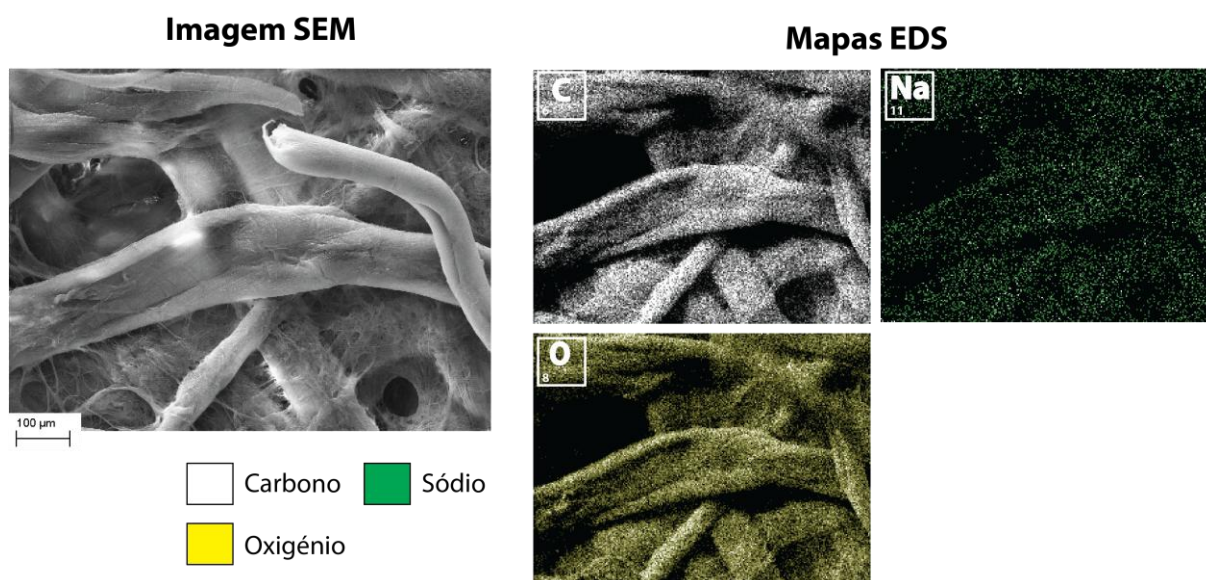


Figura 4.4 - Mapas de distribuição dos elementos detetados no papel W

Analisando os mapas obtidos verifica-se que a distribuição dos elementos carbono e oxigênio define a forma das fibras da imagem. Tendo em conta a fórmula química da molécula de celulose ($C_6H_{10}O_5$) a distribuição destes dois elementos está de acordo com o esperado, uma vez que são os seus principais constituintes.

A presença de quantidades residuais de sódio é esperada em papéis brancos, uma vez que o composto clorato de sódio (NaClO_3) é um dos agentes de branqueamento mais utilizados em pastas de papel [66]. No entanto, em relação à quantidade de carbono e oxigênio o sódio está presente em quantidades residuais, uma vez que no espectro cumulativo não é sequer perceptível um pico correspondente a este elemento. Por outro lado, uma vez que o papel W é um substrato otimizado para cromatografia, a sua produção pode recorrer a compostos que melhorem as suas capacidades óticas.

Na Figura 4.5 podem observar-se imagens de SEM com ampliação idêntica às apresentadas anteriormente desta vez correspondentes a uma amostra de papel C.

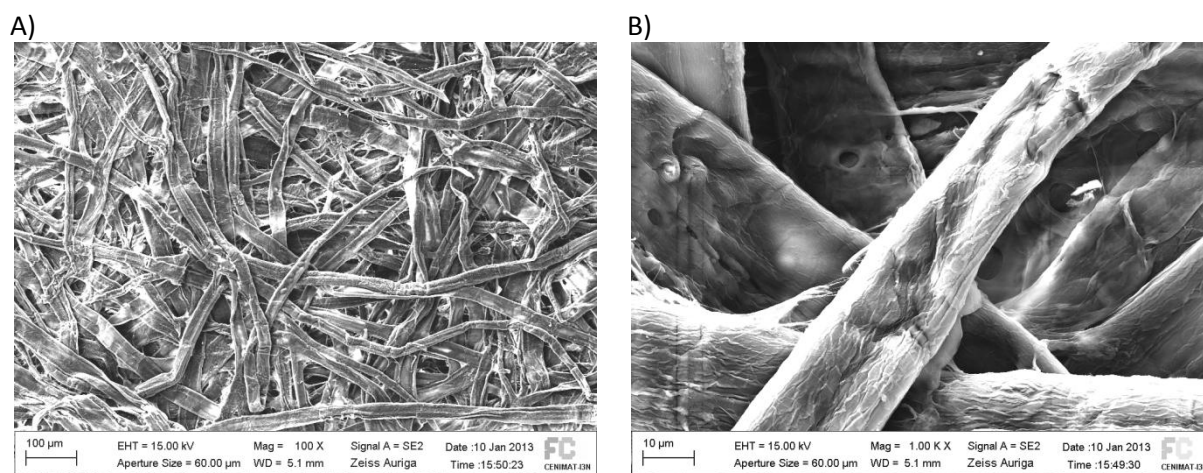


Figura 4.5 - Imagem de SEM de uma amostra de Papel C ampliada: A) 100x B) e 1000x.

Este substrato apresenta uma morfologia superficial semelhante àquela que foi registada para o papel Whatman. Na imagem de ampliação 100x, como anteriormente pode observar-se a rede de fibras entrelaçadas que formam a folha, no entanto, nesta amostra as fibras superficiais aparentam ser mais achatadas. Verifica-se ainda que a densidade de fibras neste papel aparenta ser menor que a da amostra anterior. De referir ainda que neste papel não se identificam os aglomerados de fibras menores característicos do papel W, como se pode verificar na imagem de ampliação 1000x.

À semelhança do que foi apresentado anteriormente, na Figura 4.6 encontra-se o espectro EDS do papel C.

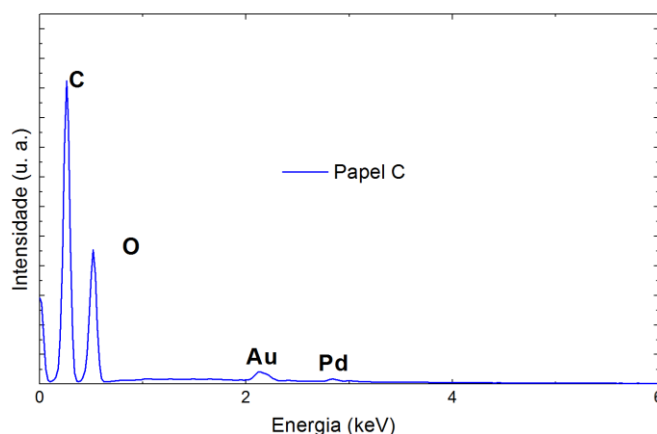


Figura 4.6 - Espectro EDS da amostra de papel C

O espectro obtido para esta amostra é semelhante ao espectro do papel W, apresentando os mesmos quatro picos característicos. Ocorrem para as energias de 0,25 keV, 0,52 keV, 2,14 keV, 2,84 keV e são relativos aos elementos carbono, oxigénio, ouro e paládio respetivamente.

Na Figura 4.7 encontram-se os mapas de distribuição dos elementos encontrados no papel de filtro de café.

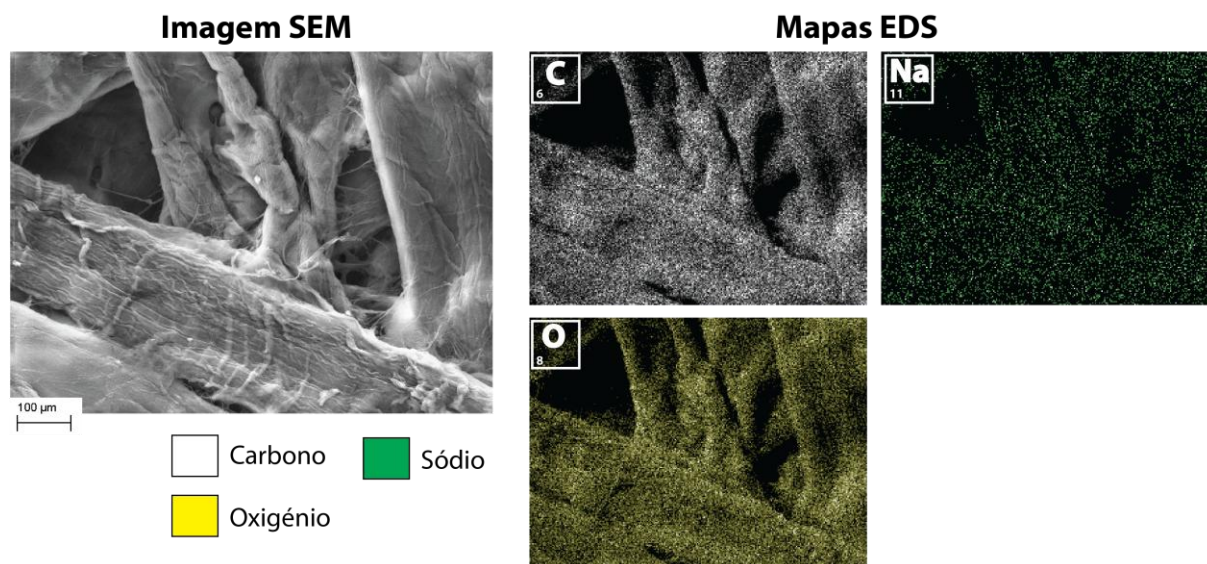


Figura 4.7 - Mapas de distribuição dos elementos detetados no papel C.

Igualmente ao que se verificou nos mapas EDS do papel W, os elementos carbono e oxigénio definem a forma das fibras presentes na zona de análise. Neste papel foi ainda detetado o elemento sódio em quantidade residual, como se pode verificar pelo seu mapa de distribuição (verde).

Na Figura 4.8 estão representadas duas imagens SEM relativas à amostra de papel B.

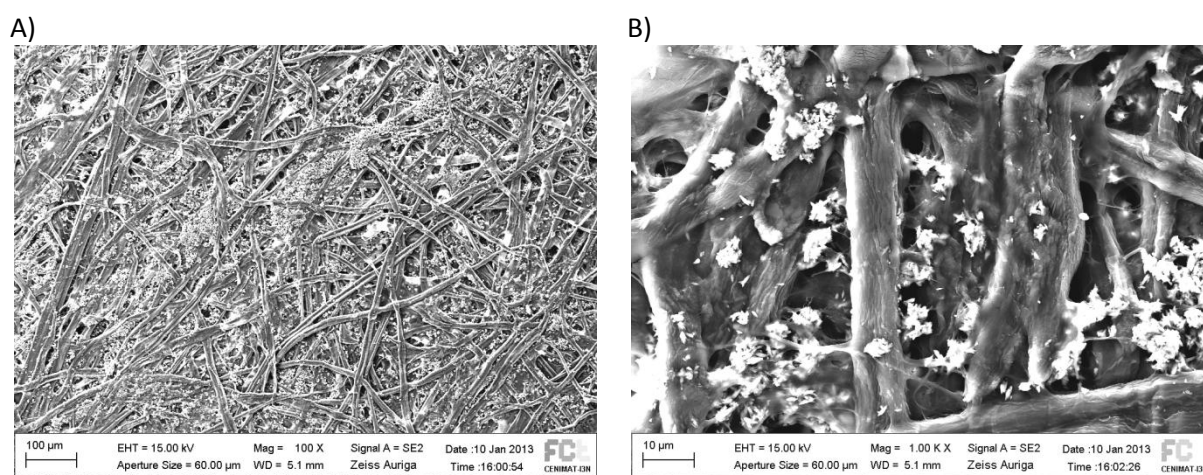


Figura 4.8 - Imagem de SEM de uma amostra de Papel B ampliada: A) 100x e B) 1000x

Na imagem ampliada 100x distinguem-se as fibras de celulose entrelaçadas, à semelhança dos papéis W e C. Estas apresentam uma forma cilíndrica achatada similar à forma de fibra encontrada no papel C, no entanto este substrato aparenta maior densidade de fibras. Além das características morfológicas análogas às amostras anteriores, identificam-se aglomerados de outros

materiais a cobrir as fibras e nos espaços entre elas. A elevada densidade de fibras e o revestimento originam um papel com menos poros (zonas pretas) e com uma superfície mais uniforme, uma vez que este substrato é destinado a impressão e escrita.

Na Figura 4.9 pode observar-se o espectro EDS da amostra de papel B.

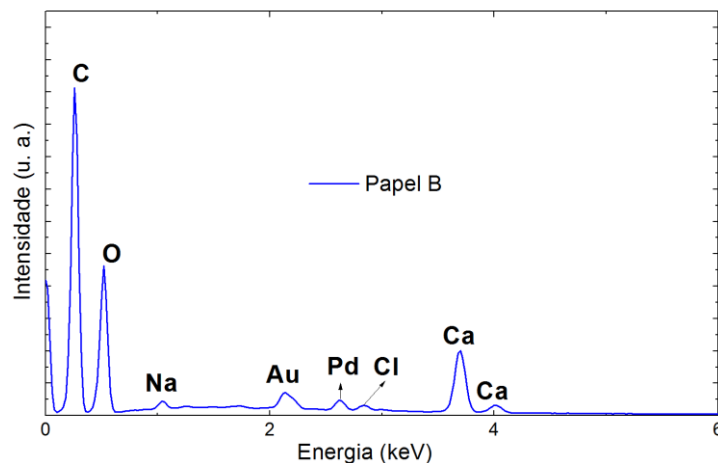


Figura 4.9 - Espectro EDS da amostra de papel B.

No espectro resultante podem observar-se os mesmos picos que estão presentes nas amostras W e C, correspondentes a carbono ($E = 0,26$ keV), oxigénio ($E = 0,52$ keV), ouro ($E = 2,14$ keV) e paládio ($E = 2,84$ keV). Nesta amostra de papel foram ainda detetados outros elementos em quantidades não residuais, nomeadamente cálcio ($E = 3,7$ e $4,0$ keV), sódio ($E = 1,04$ keV) e cloro ($E = 2,84$ keV). A morfologia superficial deste substrato sugeria a presença de outros materiais, o que se confirma com a análise EDS. Na Figura 4.10 encontram-se os mapas de distribuição dos elementos encontrados na amostra de papel B.

Os mapas de distribuição do papel B revelam, de forma similar às análises anteriores, que os elementos carbono e oxigénio são os seus principais constituintes. Uma vez mais se pode observar a forma das fibras de celulose nos mapas de distribuição destes dois elementos. O elemento cálcio está presente numa proporção considerável em relação ao carbono e oxigénio, formando aglomerados densos entre as fibras. Considerando um dos principais aditivos usados na indústria do papel, o carbonato de cálcio, de fórmula química CaCO_3 é possível justificar a distribuição deste elemento. Este composto é essencial na indústria de papel, nomeadamente na alteração das propriedades óticas, formando aglomerados porosos que conferem opacidade e brilho ao papel. Os aglomerados deste composto são porosos, o que melhora a capacidade de receção de tinta, pelo que é mais utilizado em substratos destinados a escrita e impressão [12], [13], [16]. Por outro lado, o carbonato de cálcio, por ser constituído por oxigénio, permite justificar o aparecimento da forma destes aglomerados no espectro deste elemento, o que não se verificou nas amostras anteriores.

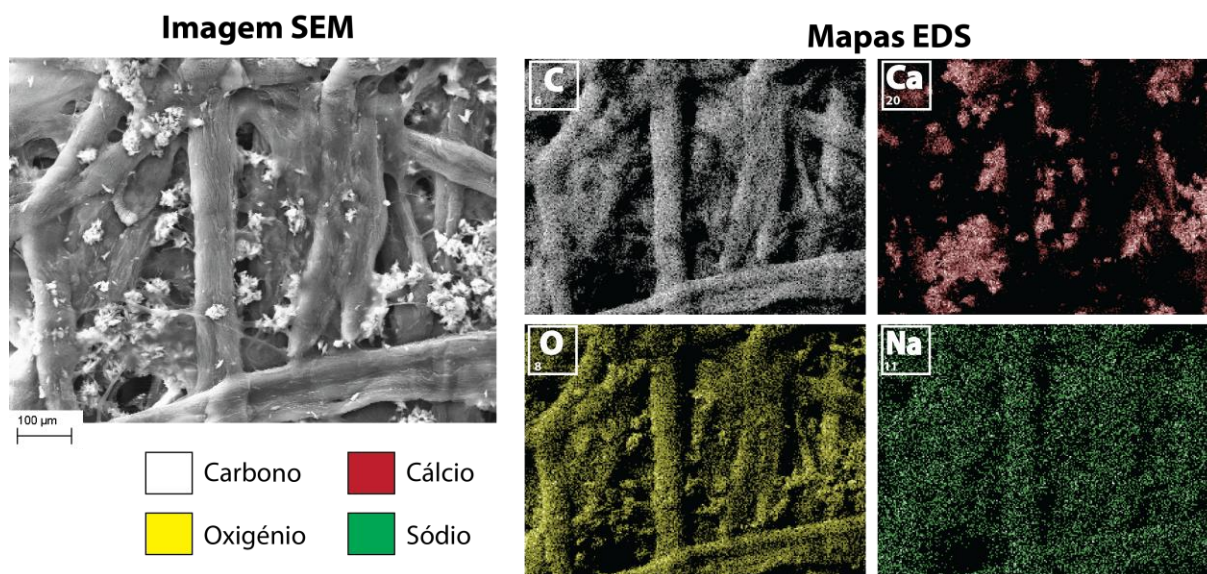


Figura 4.10 - Mapas de distribuição dos elementos detetados no papel B.

Na Figura 4.11 podem observar-se duas imagens SEM relativas a uma amostra de papel R.

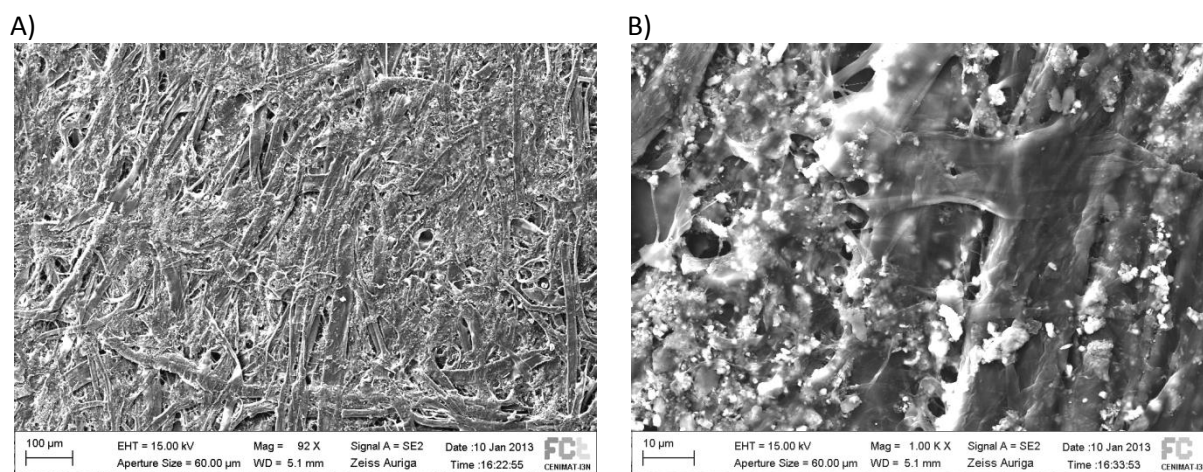


Figura 4.11 - Imagem de SEM de uma amostra de Papel R ampliada 100x e 1000x

Em termos de morfologia superficial este papel apresenta bastantes semelhanças com o substrato B analisado anteriormente. É possível identificar as fibras de celulose cobertas por um material em forma de aglomerados densos. Esta amostra apresenta assim um baixo número de poros superficiais e uma superfície homogénea, o que se justifica pelo facto de este papel ser maioritariamente destinado a impressão e escrita.

O espectro de EDS da amostra de papel R está representado na Figura 4.12. No espectro obtido podem observar-se os picos correspondentes a carbono ($E = 0,26$ keV), oxigénio ($E = 0,52$ keV), sódio ($E = 1,04$ keV), magnésio ($E = 1,26$ keV), alumínio ($E = 1,48$ keV), silício ($E = 1,74$ keV), ouro ($E = 2,14$ keV), paládio ($E = 2,84$ keV) e cálcio ($E = 3,70$ e $4,02$ keV). A presença de silício e alumínio sugere a presença de caulinita ($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), um silicato de alumínio que é um dos principais aditivos usados na produção de papel. Do mesmo modo que se concluiu para o papel B, a presença de cálcio sugere o uso de carbonato de cálcio na produção deste papel.

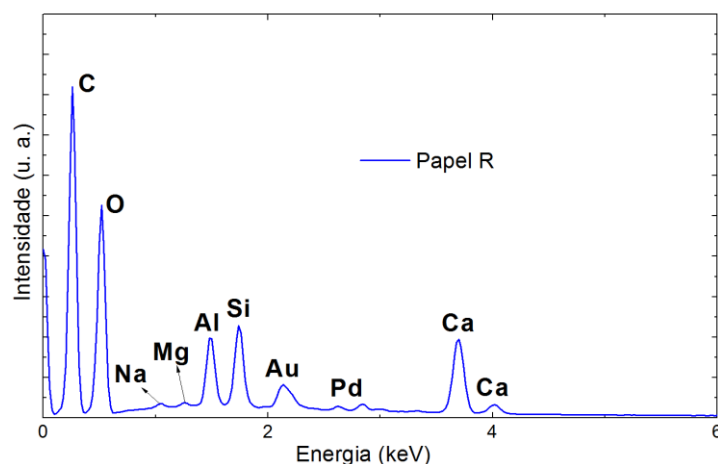


Figura 4.12 - Espetro EDS da amostra de papel R.

Os mapas de distribuição dos elementos detetados nesta amostra de papel estão representados na Figura 4.13.

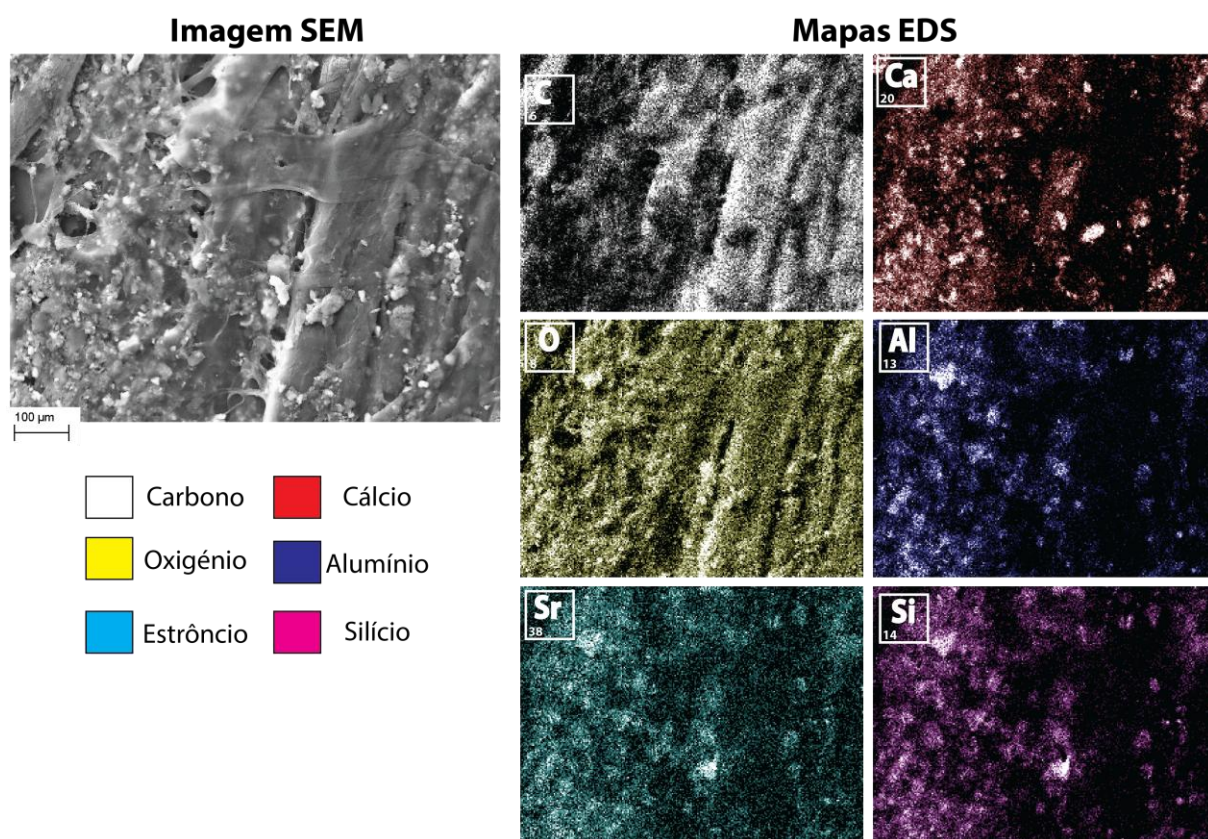


Figura 4.13 - Mapas de distribuição dos elementos detetados no papel R.

De uma forma semelhante ao que foi descrito para as outras amostras de papel, nos mapas de carbono e oxigénio é possível identificar a forma das fibras de celulose que constituem a folha. Igualmente ao que se verificou no papel B esta amostra apresenta aglomerados de cálcio e no mapa de distribuição de oxigénio é possível observar os aglomerados de material não celulósico. Deste modo confirma-se o uso de carbonato de cálcio nesta amostra. Os elementos silício e alumínio apresentam mapas de distribuição semelhantes, o que permite confirmar a presença de caulinita

nesta amostra de papel. O elemento estrôncio, apesar de possuir um pico perceptível no espectro EDS, apresenta um mapa de distribuição de intensidade considerável. A presença deste elemento pode estar relacionada com resíduos provenientes da utilização dos papéis que foram reciclados para produzir este substrato.

4.1.1.2 Cera de impressão

Na Figura 4.14 estão representados os mapas de distribuição dos elementos detetados na cera de impressão.

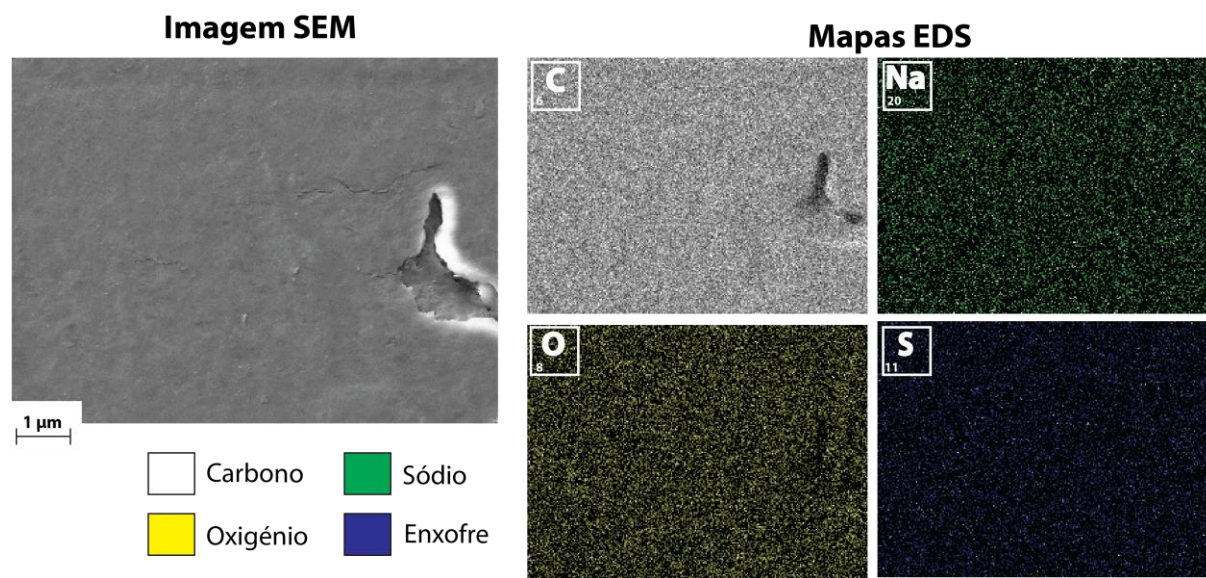


Figura 4.14 - Mapas de distribuição dos elementos detetados na cera de impressão.

Observando os mapas obtidos pode concluir-se que o carbono é o principal constituinte da cera de impressão. Na área analisada foram ainda detetados os elementos oxigénio, sódio e enxofre. Uma vez que a cera é feita de parafina, cuja composição química se baseia em hidrocarbonetos (C_nH_{n+2}), a distribuição de carbono está de acordo com o esperado. Os restantes elementos podem ter origem nas resinas e corantes adicionados à parafina.

4.1.2 Ângulo de Contacto

O ângulo de contacto permite medir a afinidade dos substratos para materiais líquidos. Na perspetiva do fabrico de microplacas, os substratos devem apresentar um baixo ângulo de contacto, uma vez que é necessário que penetrem na rede de fibras do papel. Usando água como o líquido e as amostras de papel como superfície sólida conclui-se que os papéis em estudo são hidrofóbicos ou hidrófilos. A capacidade de absorver soluções aquosas é uma propriedade essencial às microplacas de papel, uma vez que a maioria das reações biológicas ocorre em meio aquoso. Por outro lado, a deposição e difusão de cera no papel deve torná-lo hidrofóbico, visto que as barreiras de cera visam delimitar o fluxo de soluções.

Na Figura 4.15 estão representadas as imagens a partir das quais se calculou os ângulos de contacto das amostras de papel analisadas. Pelos perfis obtidos e resultantes ângulos de contacto, verifica-se que os papéis W e C são hidrófilos, apresentando valores de 12° e 18,3°, respetivamente.

A caracterização morfológica revelou que estas duas amostras apresentam elevada porosidade, o que é confirmado por esta técnica. O menor ângulo de contacto obtido para o papel W pode ser justificado pela maior espessura desta amostra, que representa um maior "reservatório" de espaços entre as fibras.

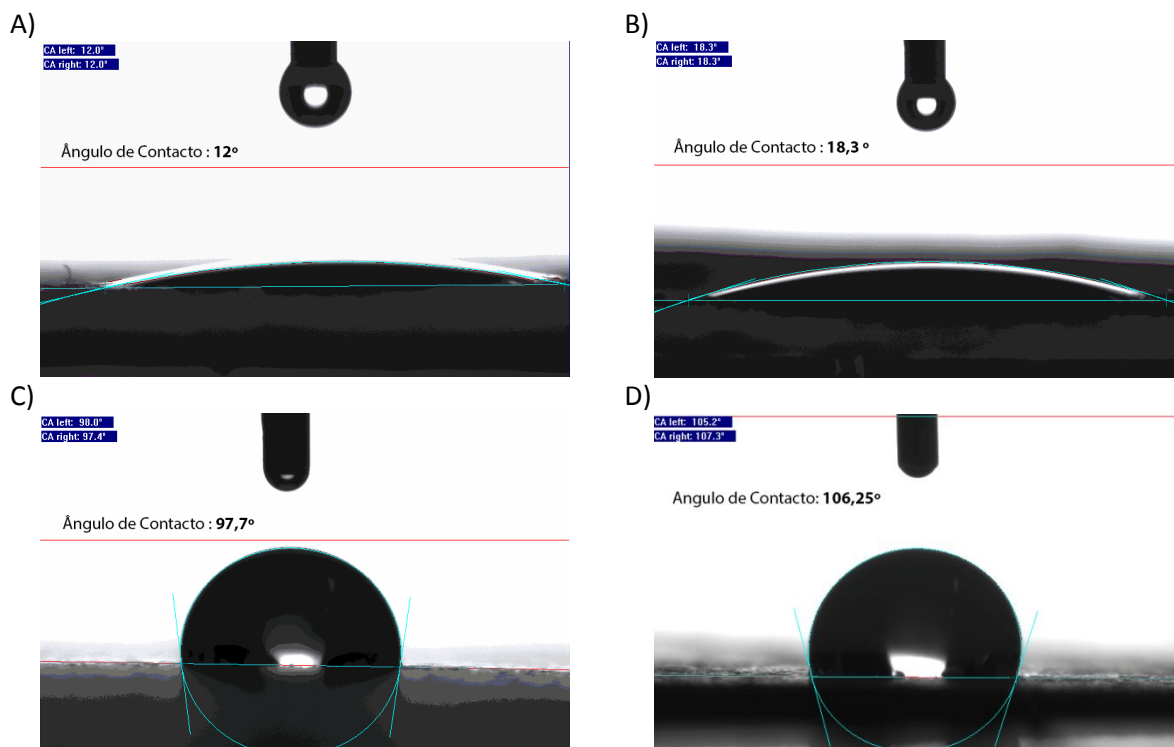


Figura 4.15 - Ângulo de contacto das amostras de: A) papel W, B) papel C, C) papel B e D) papel R.

Os papéis B e R revelam um comportamento hidrofóbico com ângulos de contacto de 97,7° e 106,25°, respetivamente. A sua caracterização morfológica revelou que são mais densos que as amostras dos papéis W e C, pelo que se esperava uma menor afinidade para a água. Por outro lado a caracterização química dos papéis de impressão (B e R) revelou a presença de compostos minerais. Os compostos encontrados (caulinita e carbonato de cálcio) são usados na indústria papelreira para alterar propriedades do papel como a porosidade.

De acordo com os dados obtidos com esta técnica, apenas os papéis W e C possuem as propriedades necessárias à sua aplicação no âmbito deste trabalho. No entanto, como foi referido, é necessário conceder propriedades hidrofóbicas a certas zonas do papel. Tais propriedades são conseguidas através da aplicação de cera. Na Figura 4.16 apresenta-se a imagem de uma gota de água destilada depositada sobre uma superfície de papel W com cera difundida.

O perfil da gota obtido revela que a superfície é hidrofóbica, com um ângulo de contacto de 126,4°. Deste modo verifica-se que a impressão e difusão de uma camada de cera conferem propriedades hidrofóbicas ao papel. Este comportamento permite a criação de dispositivos com geometrias complexas de zonas hidrofóbicas e hidrófilas para conduzir reagentes e delimitar zonas de reação.

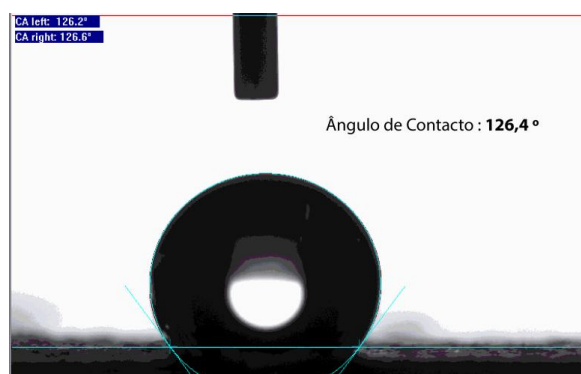


Figura 4.16 - Ângulo de contacto de uma amostra de papel W com cera difundida.

4.1.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier - ATR

4.1.3.1 Substratos

A espectroscopia de infravermelho permite obter rápida e facilmente informação acerca da composição química da amostra em estudo, permitindo identificar as ligações químicas entre os seus elementos. Em particular o módulo ATR dispensa o tratamento prévio das amostras de papel, reduzindo o tempo de execução da análise e facilitando a sua caracterização.

Numa primeira análise observa-se que os espectros de infravermelho das quatro amostras analisadas apresentam semelhanças, o que se deve ao principal constituinte de todas as amostras (i. e. celulose). Os espectros das amostras de papel W e C apresentam apenas as bandas características do espectro ATR de celulose, no entanto é possível identificar bandas correspondentes a outros compostos nos espectros das amostras B e R.

Analisando as bandas comuns a todos os espectros, ou seja, as bandas características do espectro de celulose, identifica-se facilmente o pico de absorvância correspondente ao estiramento da ligação dos grupos hidroxilo (O-H) entre os números de onda 3200 e 3400 cm^{-1} e pico associado ao estiramento da ligação C-O (2900 cm^{-1}). O pico no número de onda 1635 cm^{-1} está associado à adsorção de água nas fibras de celulose. A região dos espectros cujo número de onda é inferior a 1500 cm^{-1} é denominada impressão digital, por ser a zona associada a ligações covalentes simples, na qual apenas pequenos grupos de átomos (por exemplo grupos funcionais) são afetados pela radiação. Nesta zona identificaram-se várias bandas presentes em todos os espectros, que são características do espectro de celulose. As bandas de absorção a 1425 e 1370 e 1280 cm^{-1} são características da deformação das ligações dos grupos metileno (CH_2). De referir que no espectro do papel B apenas se observa uma banda no intervalo de números de onda (1350 - 1550 cm^{-1}) e que no papel R o segundo pico está mascarado pelo primeiro, de maior intensidade. A banda de absorção em 1205 cm^{-1} está associada à deformação das ligações C-OH e C-CH dos monómeros de glucose. Todos os espectros apresentam a maior banda de absorção no intervalo 1200 - 920 cm^{-1} , uma vez que é a zona de maior contribuição de polissacarídeos como a celulose. Na zona ascendente desta banda identificam-se 2 picos em 1160 e 1100 cm^{-1} , associados à vibração do anel de carbono da glucose e da ligação glicosídica C-O-C, respetivamente. Estes picos são facilmente identificáveis nos espectros de W e C, apresentando menor intensidade nos espectros de B e R. Relativamente ao platô da banda de absorção identificam-se três picos distintos nos espectros de W e C (1055, 1025 e 1000 cm^{-1}), dois picos no espectro de R (1025 e 1000 cm^{-1}) e um pico no espectro de B (1025 cm^{-1}). Estas três bandas de

absorção correspondem à vibração da ligação C-OH do 2º álcool (1055 cm^{-1}), da ligação C-OH do primeiro álcool (1025 cm^{-1}) e à deformação de ligações -CH- (1000 cm^{-1}). Por fim, do espectro característico da celulose foi ainda identificada em todas as amostras uma banda a 895 cm^{-1} , associada à deformação simétrica da ligação $\text{C}_1\text{-O-C}_4$ da glucose [15], [67–71].

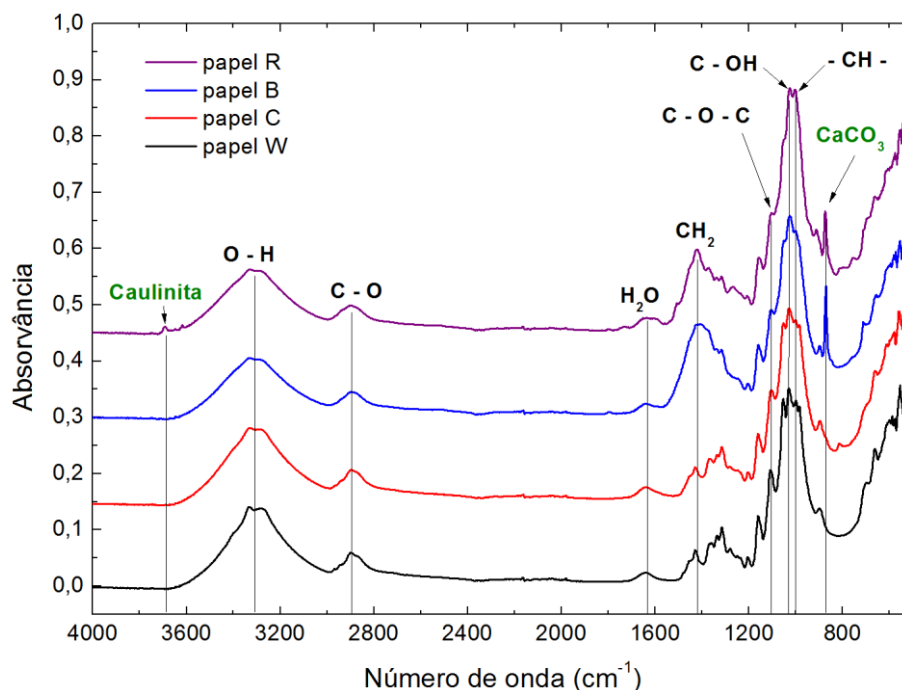


Figura 4.17 - Espectros de infravermelho (ATR) das amostras de papel analisadas.

Relativamente aos espectros das amostras dos papéis B e R foram ainda detetadas bandas de absorção características de materiais minerais, provavelmente resultado de aditivos usados durante a sua produção. O carbonato de cálcio (CaCO_3) apresenta bandas de absorção intensas a 1415 e 870 cm^{-1} . Observando os espectros verifica-se que os papéis B e R apresentam uma banda de absorção a 1415 cm^{-1} mais intensa que os papéis W e C, o que pode ser devido à presença deste composto (CaCO_3). No entanto, uma vez a mesma zona também contém bandas características da celulose, a identificação destas torna-se complicada. Não obstante a banda de absorção intensa a 870 cm^{-1} revela indubitavelmente a presença do carbonato de cálcio nestes dois papéis. No espectro do papel R foi ainda identificado um pequeno duplete em 3690 e 3620 cm^{-1} , característico de um material argiloso, a caulinita [72–74]. A caracterização química por espectroscopia de infravermelho reforça os dados obtidos na análise EDS. Os mapas EDS dos papéis B e R revelaram a presença do elemento cálcio em aglomerados que sugeriram a presença de carbonato de cálcio. Do mesmo modo, no papel R foram detetados os elementos alumínio e silício que, como confirmado pelo FTIR, provêm de um aditivo usado na indústria do papel, a caulinita ($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Estes resultados foram também confirmados por difração de raios-X, onde se identificou a estrutura cristalina de carbonato de cálcio nos papéis B e R. Nesta caracterização estrutural foram ainda identificados padrões cristalográficos característicos da caulinita [64].

Os espectros de infravermelho fornecem também informação acerca da origem das fibras que constituem as amostras de papel. A banda de absorção entre 1500 e 1510 cm^{-1} é característica de vibrações nas ligações de anéis aromáticos, ou seja, esta banda depende de espécie madeira e está associada à quantidade de lenhina presente nas amostras [75]. Observando os espectros das amostras

analisadas, verifica-se que os papéis W e C não apresentam banda de absorção no intervalo de números de onda referido, o que permite concluir que não existe lenhina nestas amostras. Uma vez que o papel W é produzido a partir de fibras de celulose provenientes de algodão, não se previa uma banda de absorção uma vez que esta planta não contém lenhina [76]. Nos espectros dos papéis B e R, devido à sobreposição de bandas, não se identifica um pico de absorção na zona característica da lenhina. No entanto ambos os espectros evidenciam uma curva ascendente no intervalo 1500 - 1510 cm^{-1} , o que sugere a presença de lenhina.

4.1.3.2 Cera de impressão

A técnica de FTIR foi aplicada à cera de impressão com o objetivo específico de comparar o espectro obtido com o de cera de parafina, o principal constituinte da cera de impressão [65]. Os espectros de infravermelho das amostras de parafina e cera de impressão encontram-se na Figura 4.18.

De acordo com o que era esperado, a cera de impressão e a parafina revelam um espectro de infravermelho semelhante. As bandas de absorção características da parafina estão presentes no espectro de infravermelho da cera de impressão.

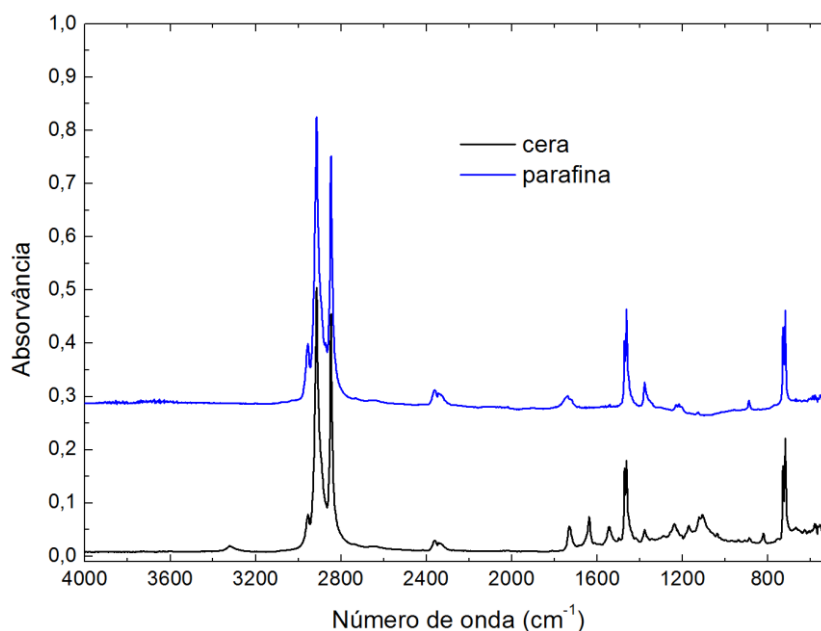


Figura 4.18 - Espectros ATR de cera de impressão e parafina.

4.1.4 Análise térmica

O presente trabalho foi desenvolvido de modo a respeitar as diretivas sumarizadas no acrónimo ASSURED. Deste modo, a caracterização térmica permite obter alguma informação relativamente às condições críticas de operabilidade transporte e armazenamento dos dispositivos. Por outro lado o processo de fabrico engloba uma fase de aquecimento a temperaturas que podem atingir 140 °C, pelo que é importante saber se o material sofre alguma transformação quando submetido a essas temperaturas.

4.1.4.1 Substratos

Na Figura 4.19 estão as curvas resultantes da análise térmica de todos os papéis em estudo. Na fase inicial, até uma temperatura de 250 °C todas as amostras apresentam o mesmo comportamento. Existe uma perda de massa por volta dos 100 °C (cerca de 2%) que corresponde a um pico endotérmico na curva DSC. Esta transição é devida à perda de água presente nas amostras e desoneração de gases.[77–79].

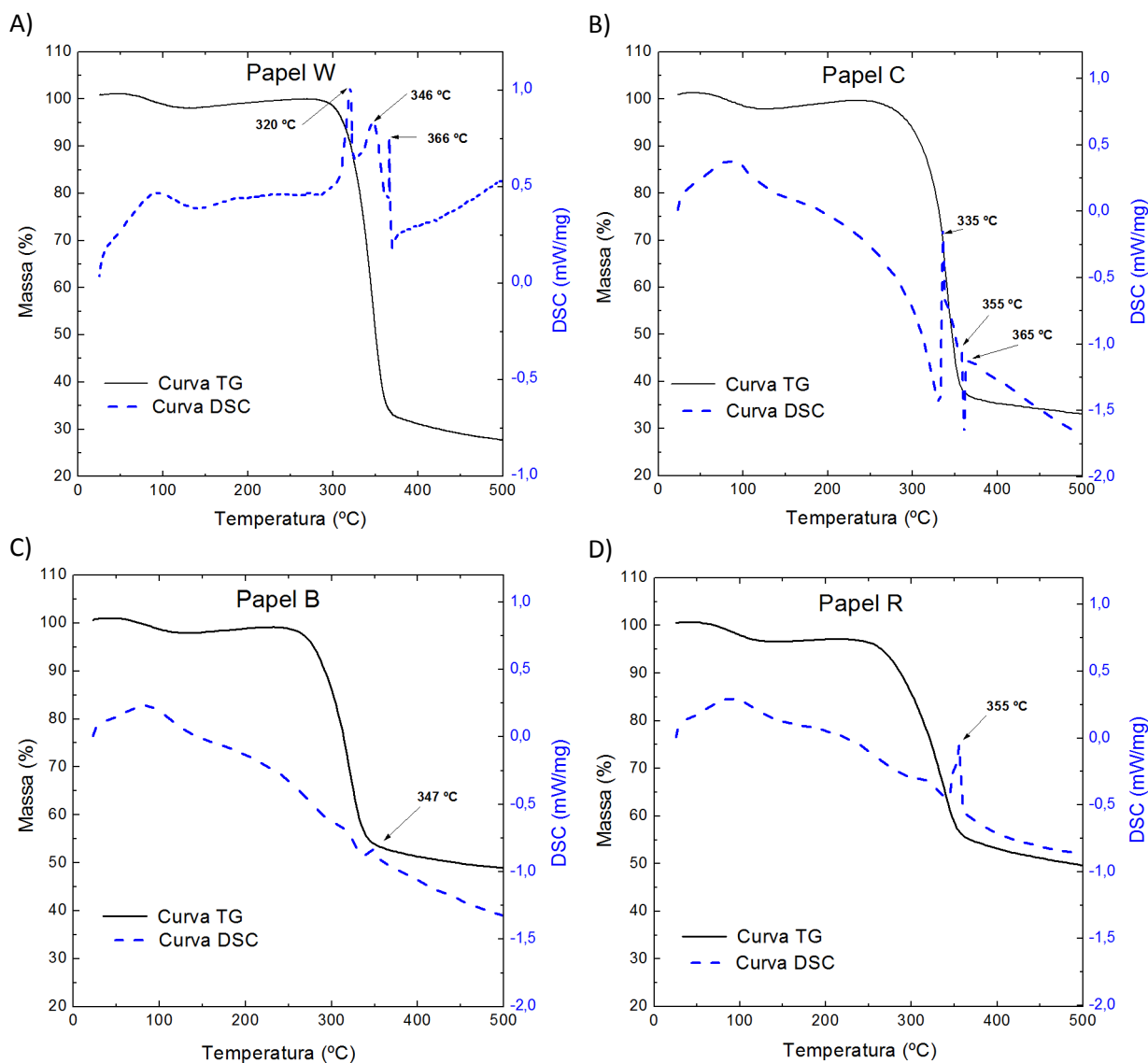


Figura 4.19 - Curvas TG e DSC de: A) papel Whatman, B) papel de filtro de café, C) papel de impressão branco e D) papel reciclado.

O processo de degradação da celulose na presença de uma atmosfera oxidativa acontece em duas etapas. A primeira ocorre no intervalo de temperaturas 260 e 360 °C e corresponde a uma perda de massa de cerca de 90 %. A segunda perda de massa ocorre entre as temperaturas de 360 e 530 °C. A este processo de degradação estão associados três picos endotérmicos na curva DSC [11][14].

Os gráficos resultantes da análise TG revelam que todas as amostras apresentam a sua maior perda de massa dentro do intervalo de temperatura previsto para a degradação de celulose. Os três

picos endotérmicos característicos do processo apenas estão presentes nas curvas DSC dos papéis W e C. Nas amostras B e R regista-se a ocorrência de um pico isolado, de maior intensidade na amostra R. Deste modo, é válido afirmar que as amostras de papel B e R possuem uma menor percentagem de celulose do que aquela presente nas amostras de W e C. As análises EDS e FTIR indicaram a presença de compostos minerais como o carbonato de cálcio e caulinita nas amostras dos papéis B e R. A presença destes compostos pode explicar as diferenças observadas nas curvas de degradação e DSC, uma vez que compostos minerais apresentam temperaturas de degradação maiores que a celulose.

A celulose, a hemicelulose e a lenhina, principais constituintes da pasta de madeira, degradam-se a temperaturas diferentes de acordo com a sua estrutura. A lenhina é o primeiro composto a sofrer degradação a cerca de 200 °C seguida das hemiceluloses, a cerca de 220 °C. A celulose é a última a iniciar a decomposição. Este comportamento térmico encontra-se diretamente relacionado com a cristalinidade dos compostos referidos. Estruturas cristalinas como a celulose e compostos minerais apresentam elevada estabilidade térmica e consequentemente temperaturas de degradação elevadas. O oposto verifica-se para compostos amorfos como a lenhina e hemiceluloses que se degradam a temperaturas inferiores. A cristalinidade de substratos celulósicos pode ser avaliada através do Índice de Cristalinidade (Ic). O Ic define a relação entre a parte cristalina e a parte amorfa do material e foi calculado a partir de difração de raios-X. O papel W foi o substrato analisado que apresentou maior valor de Ic (86,3 %), e como tal é a amostra que se degrada a uma temperatura mais elevada (385 °C), seguido do papel C (Ic = 75,6 %; T = 250 °C), do papel B (Ic 74,7 %; T = 245 °C), e finalmente do papel R (Ic = 70,1 %; T = 235 °C) [64].

A análise térmica permite ainda retirar informação acerca da quantidade relativa de celulose e outros constituintes presentes em cada papel analisado. Considerando que a temperatura de degradação da celulose está compreendida no intervalo de caracterização, os resíduos resultantes serão resultado de compostos adicionados às fibras durante a produção de papel. Deste modo, verificou-se, pela análise das curvas TG, que os papéis de impressão R e B são os que apresentam maior percentagem de componentes não celulósicos na sua constituição, pois demonstram uma percentagem de massa final de 50% e 49%, respetivamente. Do mesmo modo pode concluir-se que os papéis W e C (massa final de 27% e 33%, respetivamente) apresentam menor percentagem de componentes adicionais na sua constituição. Estes resultados são suportados também pelas outras técnicas de caracterização analisadas (SEM, EDS e FTIR), que demonstram a presença de compostos minerais na constituição dos papéis de impressão.

4.1.4.2 Cera de impressão

A caracterização térmica da cera de impressão permite não só avaliar o seu comportamento térmico, como também otimizar o processo de fabrico dos dispositivos.

Pelas razões enunciadas anteriormente, é igualmente importante avaliar o comportamento térmico da cera de impressão. Além disso o fabrico dos dispositivos depende da fusão de cera sólida, pelo que esta análise pode fornecer dados importantes para a otimização desse processo.

As curvas TG e DSC obtidas por caracterização térmica da cera de impressão estão representadas na Figura 4.20. Como esperado, a curva DSC apresenta um pico endotérmico a cerca de 80 °C que corresponde a uma transição de fase (sólido - líquido). Relativamente à curva TG, verifica-se perda de massa para temperaturas superiores a 300 °C. A caracterização térmica efetuada aos materiais permite assim garantir que os dispositivos fabricados de acordo com esta tecnologia

(excetuando os reagentes) serão capazes de suportar as condições extremas de temperatura sem se degradarem

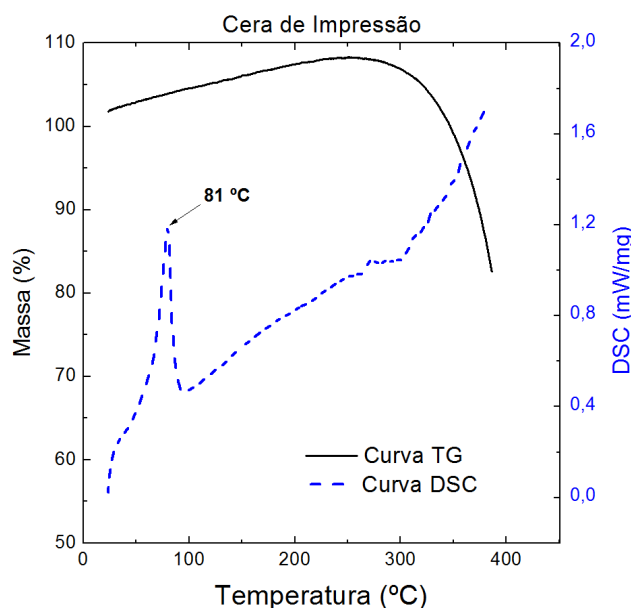


Figura 4.20 - Curvas TG e DSC da cera de impressão

4.2 Escolha do substrato

Do mesmo modo que a escolha de uma microplaca convencional apropriada é definida pela aplicação a desenvolver, a escolha de um papel para produzir uma microplaca pode também depender da aplicação a desenvolver. No âmbito deste trabalho é necessário que o papel apresente propriedades que permitam o fluxo de soluções por capilaridade na sua rede de fibras e que permitam também a adesão da cera hidrofóbica que delimita os canais.

Como foi referido, o papel de cromatografia Whatman Nº 1 foi utilizado anteriormente em aplicações de microfluídica, pelo que se apresenta como um substrato de referência no que diz respeito às propriedades necessárias para a aplicação em produção de microplacas. A sua caracterização química revelou uma elevada quantidade relativa de celulose na sua constituição. A caracterização morfológica e baixo ângulo de contacto indicam que possui a porosidade necessária para condução de soluções. Revelou também estabilidade térmica, degradando-se apenas para temperaturas superiores a 300 °C.

O papel de filtro de café revela uma composição química semelhante ao papel W, e é poroso, possuindo as propriedades necessárias para produção dos dispositivos. No entanto o formato deste papel impede o seu uso direto na impressora e apresenta dimensões menores que as de uma microplaca convencional. Por outro lado devido à reduzida espessura e densidade, este papel revelou ser inadequado para o método de impressão a cera. Durante o processo de formação das barreiras hidrofóbicas o papel C evidencia valores de difusão lateral superiores aos observados para o papel W. Uma vez que um dos objetivos principais é reproduzir as dimensões de microplacas convencionais decidiu usar-se o papel W, uma vez que revelou ser mais apropriado o método de produção.

A caracterização dos papéis de impressão (branco e reciclado) permite concluir que não podem ser usados no âmbito deste trabalho, uma vez que revelaram ser hidrofóbicos (ângulos de

contacto maiores que 90°). A sua morfologia superficial e composição química revelam o uso de aditivos minerais na sua produção que, além de lhes conferirem propriedades hidrofóbicas, podem afetar o funcionamento das biomoléculas de reconhecimento e enzimas associadas aos sistemas de revelação.

4.3 Produção das microplacas

4.3.1 Tecnologia de impressão

A impressão com tinta sólida (cera de impressão) pode ser sumarizada em três passos. A unidade de manutenção limpa a superfície do rolo de impressão de resíduos de impressões prévias e aplica uma fina camada de óleo de silicone. Seguidamente a cabeça de impressão, uniformemente aquecida a 135°C , pulveriza micro gotas de cera no rolo de impressão com elevada precisão. Este rolo é mantido a 65°C de modo a que a tinta não solidifique completamente enquanto não é transferida para o papel. A esta temperatura a cera torna-se num semissólido maleável. Quando as cabeças de impressão terminam a construção da imagem no rolo de impressão, o papel no qual vai ser feita a impressão é forçado a passar entre os dois rolos. Devido ao calor e pressão exercidos a imagem é transferida do rolo de impressão para o papel num só passo. Quando o papel sai da impressora a tinta está totalmente seca e a impressão está pronta a utilizar.

Na Figura 4.21 podem observar-se alguns dos constituintes internos da impressora que fazem parte do processo de impressão descrito em cima.

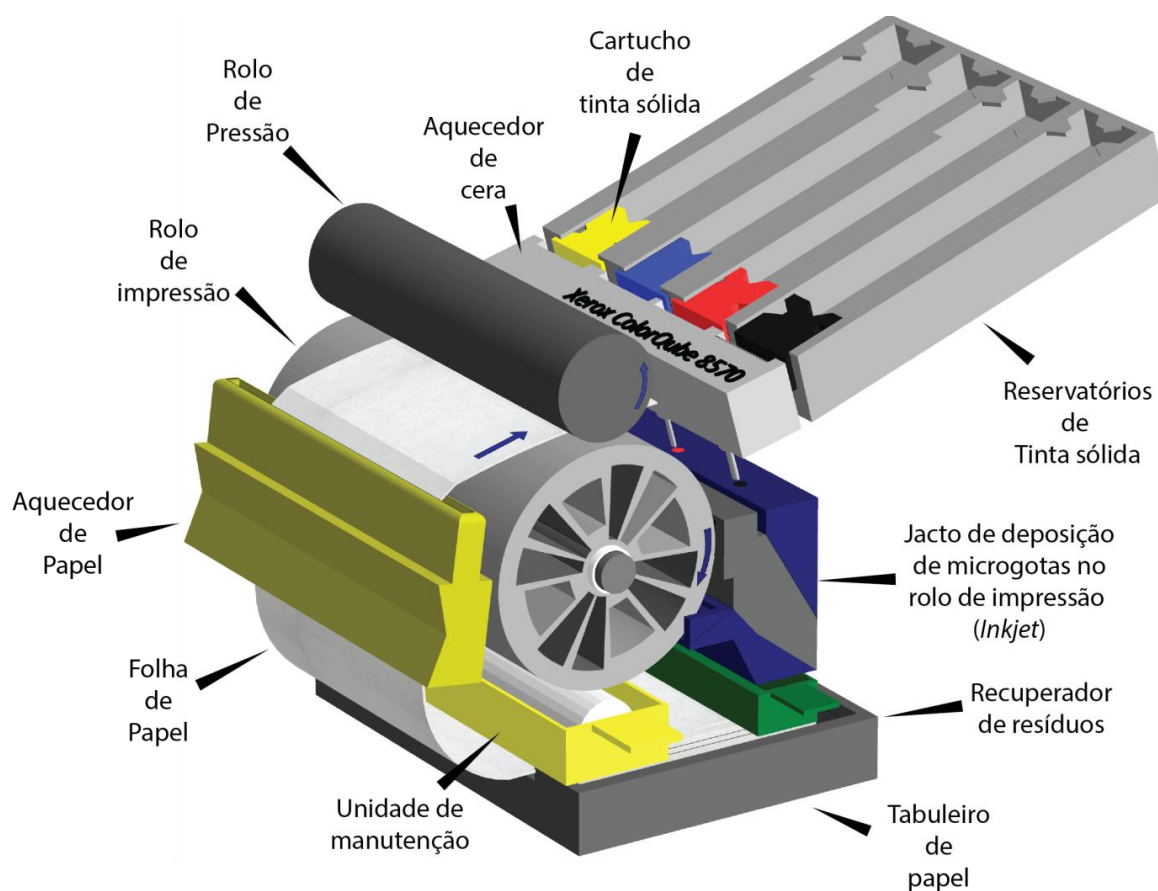


Figura 4.21 - Representação dos componentes internos da Impressora Xerox ColorQube 8570.

Foi conduzido um estudo para avaliar a precisão do processo e impressão, uma vez que o papel escolhido para fabricar os dispositivos (papel de cromatografia Whatman Nº1) não é um substrato destinado a impressão. Deste modo, imprimiram-se 5 conjuntos de linhas com larguras compreendidas entre 100 e 700 μm , em incrementos de 100 μm . No gráfico da Figura 4.22 podem observar-se os valores determinados experimentalmente para as linhas impressas em função dos valores nominais introduzidos no programa de desenho. Cada ponto corresponde à média de 5 medidas independentes e as barras de erro representam o desvio padrão entre elas.

Idealmente, estes dois parâmetros seriam iguais, no entanto os dados evidenciam que todas as linhas impressas têm dimensões maiores que as inseridas no *software* de desenho (nominais). Este fenómeno atribuiu-se a uma difusão inicial no momento da impressão. A caracterização do substrato (papel W) demonstrou que este apresenta uma elevada porosidade superficial e interior, e consequentemente um baixo ângulo de contacto. Por outro lado durante a impressão a cera é derretida atingindo temperaturas de 130 °C e o papel também é aquecido para melhorar a adesão da tinta. Estas temperaturas e o facto de a impressão durar apenas alguns segundos não permitem criar uma barreira hidrofóbica no papel no entanto, aparentam causar alguma difusão lateral.

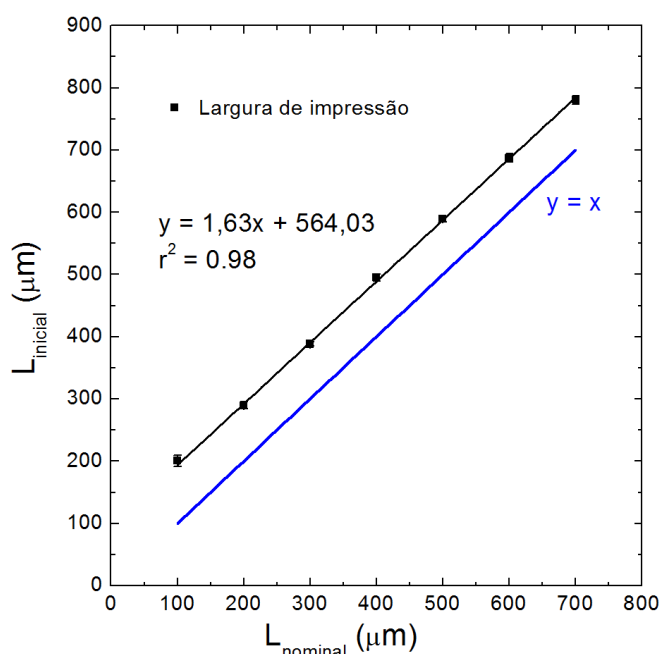


Figura 4.22 - Largura experimental das linhas impressas em função das suas dimensões nominais.

Na Figura 4.23 pode observar-se uma imagem SEM de cera impressa na superfície do papel W. A imagem foi capturada no limite da impressão de modo a evidenciar a camada uniforme de cera resultante da impressão. Este material encontra-se destacado pela coloração artificial feita em *Adobe Photoshop*. A uniformidade da impressão permite o uso do mesmo equipamento (impressora) para encapsular os dispositivos. O encapsulamento no verso das microplacas facilita o seu manuseamento impedindo a fuga das soluções pelo verso dos poços. Deste modo a microplaca pode ser colocada diretamente sobre qualquer superfície.

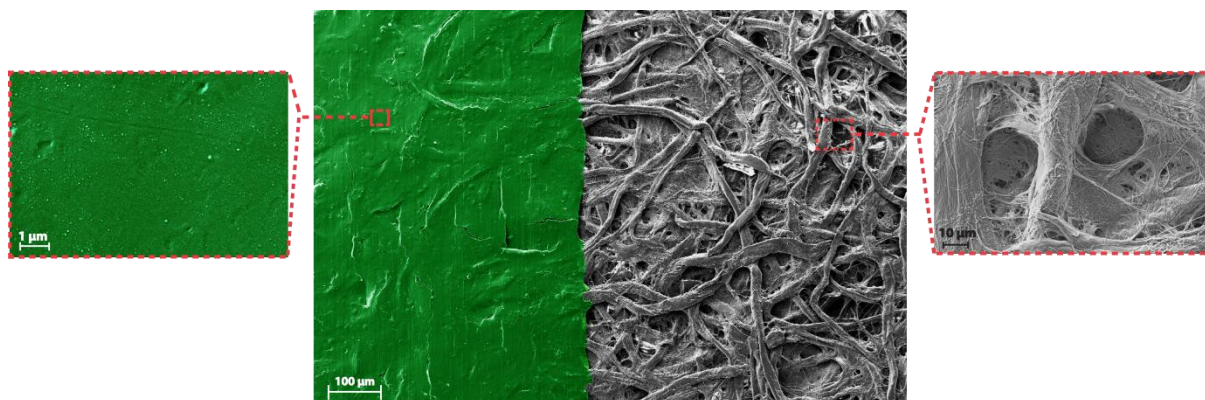


Figura 4.23 - Imagem SEM de cera impressa numa folha de papel Whatman (coloração artificial feita em *Adobe Photoshop*).

4.3.2 Modelos de difusão da cera em papel de cromatografia Whatman Nº1

O método de impressão a cera apresenta grandes vantagens em aplicações de microfluídica à base de papel, visto que é rápido, barato e apropriado para produção em massa. No entanto neste método as dimensões dos padrões finais não correspondem às suas dimensões nominais devido à difusão lateral da cera durante o processo de aquecimento. Deste modo foi efetuado um estudo para avaliar e quantificar a difusão lateral da cera, com o objetivo de otimizar a produção das microplacas.

Como referido anteriormente, o processo é descrito pela equação 1.1, já que pode ser aproximado a um fluxo capilar num material poroso. A viscosidade da cera é função da temperatura. Assumindo que o papel é mantido a uma temperatura constante durante o processo de aquecimento, todos os parâmetros da equação estão fixos. Deste modo, para uma linha de tamanho inicial L_n , a distância percorrida pela cera (difusão) desde a sua borda até ao tamanho final $L_{barreira}$ será constante, independentemente da dimensão inicial da linha. No entanto, foi reportado por Martinez et al. [61] que para tamanhos de linha suficientemente pequenos, a quantidade de cera disponível limita a difusão pelos poros do papel, desviando o processo do comportamento esperado. A equação 1.1 prevê uma quantidade ilimitada de fluido pelo que não pode ser aplicada nestas circunstâncias.

A complexidade do processo de difusão da cera no substrato poroso motivou a divisão deste estudo em duas partes distintas (Figura 4.24). Na primeira parte do estudo é avaliada a difusão em padrões nos quais se controla a quantidade de cera depositada pela espessura dos seus contornos. Escolheu avaliar-se a difusão em linhas retas de largura variável e foram medidos os seus tamanhos iniciais e finais. A segunda parte do estudo consiste em avaliar padrões nos quais a quantidade de cera não é uma limitação, no entanto também não é uma variável. Este tipo de padrão não possui contornos uma vez que é delimitado por uma camada uniforme de cera. Foi avaliada a difusão em barreiras de formato circular uma vez que a dimensão de poço é uma das principais medidas a ter em conta na reprodução de microplacas convencionais. Contrariamente ao que foi feito para as linhas onde foram medidas as dimensões iniciais e finais dos padrões, neste caso foram medidos os diâmetros iniciais e finais das zonas delimitadas pelos padrões.

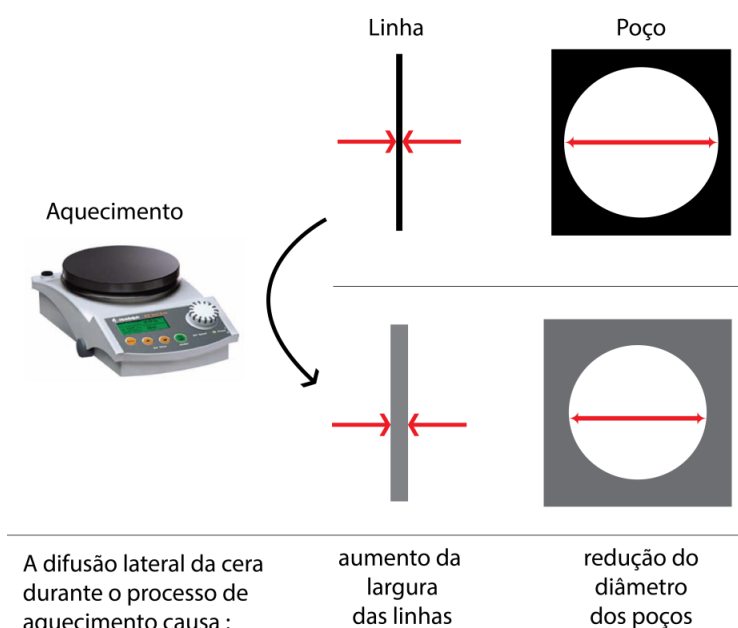


Figura 4.24 - Representação do efeito da difusão lateral da cera nos dois tipos de padrões usados para estudar este processo.

4.3.2.1 Barreiras de formato linha

Na Figura 4.25 pode observar-se um conjunto de linhas de largura entre 100 e 700 μm , fotografado antes e depois do processo de aquecimento.

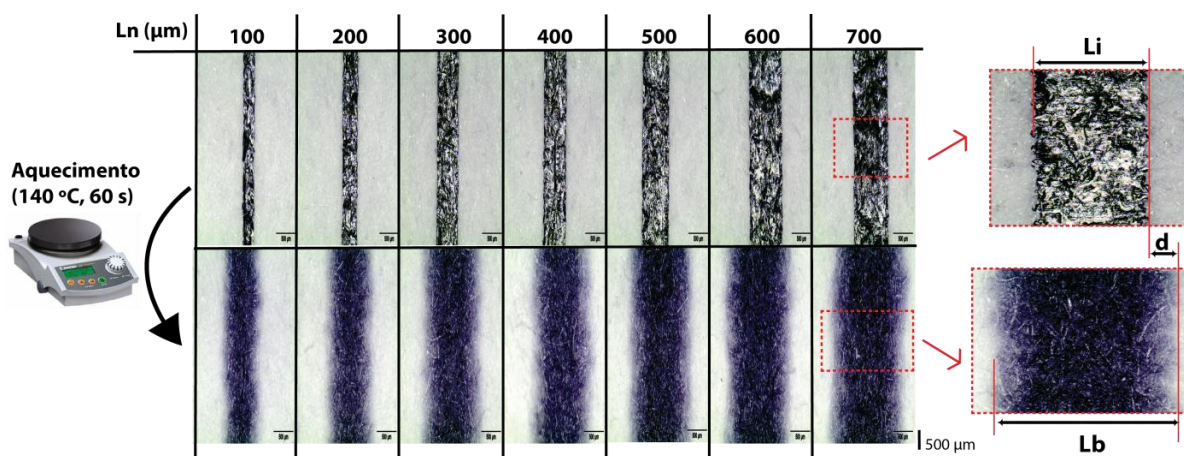


Figura 4.25 - Série de linhas (100 - 700 μm) antes e depois do processo de difusão.

Observando a Figura 4.25 verifica-se que a difusão lateral da cera provoca o aumento da largura de barreiras em formato de linha. Variando as condições do processo de aquecimento, o processo de difusão é alterado. Foram utilizadas as temperaturas 80 °C, 100 °C, 120 °C e 140 °C para intervalos de tempo de aquecimento de 60 e 120 segundos. Medindo as dimensões das linhas antes e depois do processo de aquecimento para as diferentes condições é possível observar o comportamento do processo e obter expressões que permitam prever as dimensões finais das barreiras hidrofóbicas.

Na Figura 4.26 podem observar-se as representações gráficas do valor de difusão lateral (d) em função da largura nominal das linhas (L_{nominal}). O parâmetro d foi calculado a partir da equação

3.1. Cada valor de d é a média da difusão em 5 linhas independentes e as barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas. Os gráficos referentes aos valores de difusão calculados para as restantes séries de linhas podem ser consultados no Anexo 4.

Assumindo que o processo de difusão da cera pode ser descrito pela equação 1.1, seria de esperar que, mantendo constantes a temperatura e tempo de aquecimento, o valor de difusão seria constante. No entanto, observando os gráficos verifica-se que para as linhas de menor dimensão nominal a difusão apresenta um comportamento crescente. Estes dados confirmam a influência da quantidade de cera no processo de difusão. A partir dos gráficos obtidos pode concluir-se que para 60 s de aquecimento 400 μm é a menor largura nominal que contém cera suficiente para não influenciar o processo. Para 120 s de aquecimento verifica-se que a difusão lateral depende de L_{nominal} para todos os valores medidos. Um tempo de aquecimento maior permite que a cera se espalhe à mesma velocidade durante mais tempo, exigindo assim uma maior quantidade de cera para manter um fluxo constante. Na Tabela 4.2 podem observar-se os valores médios de difusão para cada uma das séries de linhas analisada.

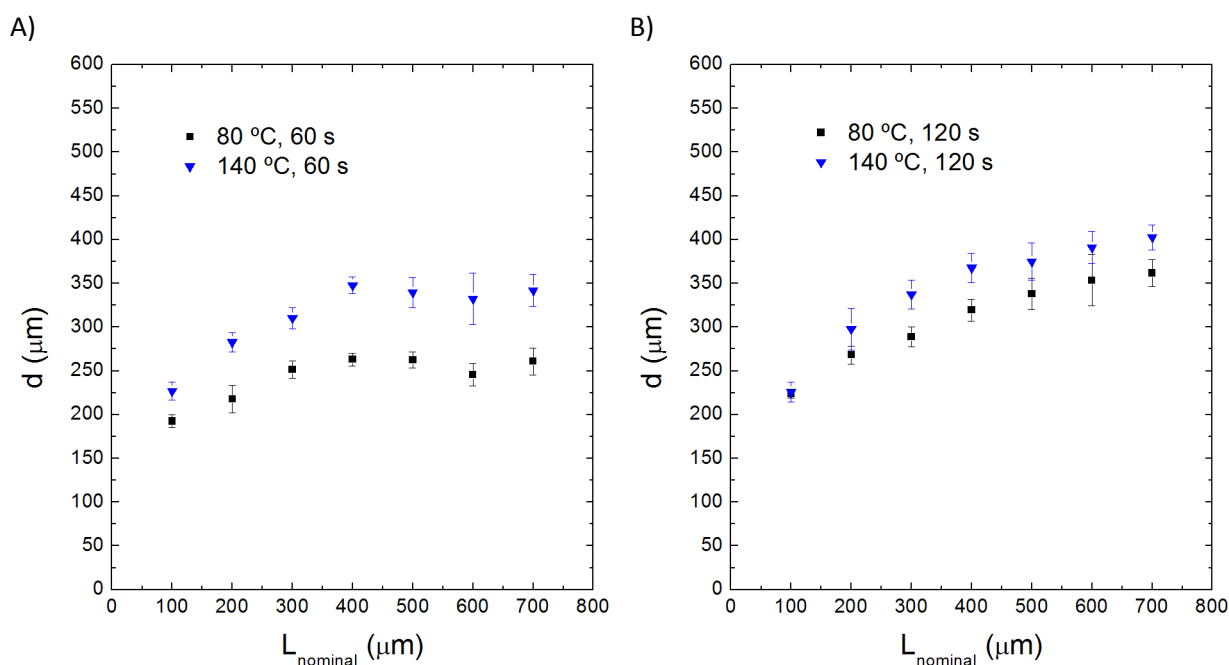


Figura 4.26 - Difusão em função da dimensão nominal da linha.

A análise gráfica da difusão permite analisar o seu comportamento, no entanto, para prever as dimensões finais das barreiras, é necessário que se a relação entre L_{barreira} e L_{nominal} possa ser representada numa função matemática. Deste modo na Figura 4.26 podem observar-se as representações gráficas de L_{barreira} em função e L_{nominal} , para as séries de linhas 1, 2, 7 e 8 (Tabela 3.1). Os gráficos relativos às restantes séries de linhas podem ser observados no Anexo 5.

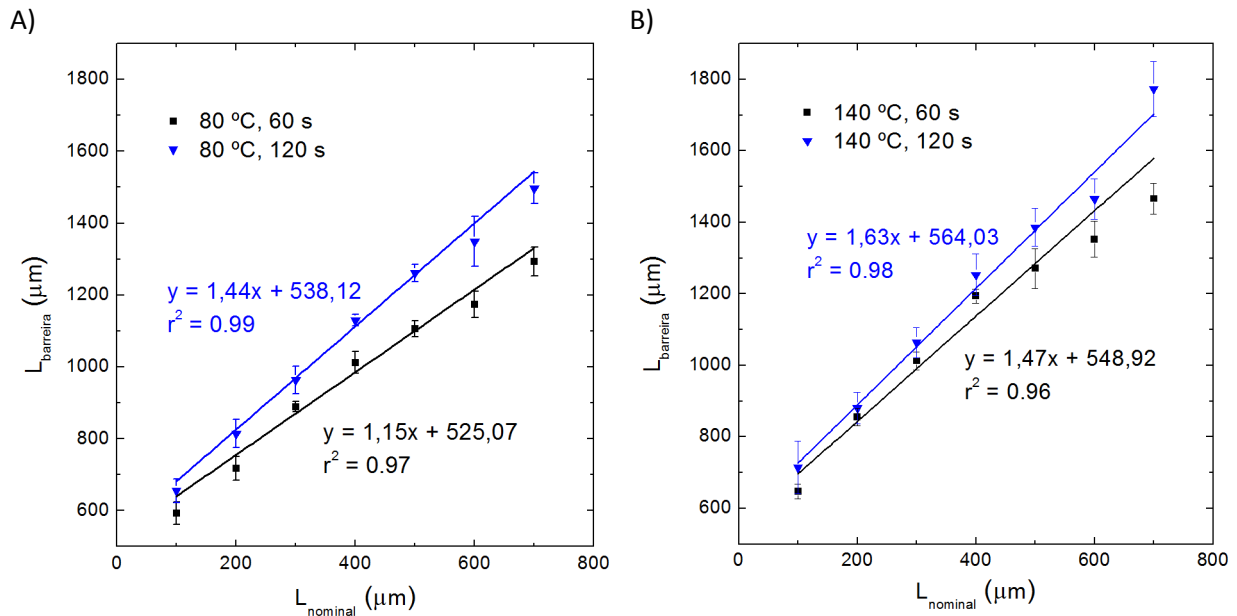


Figura 4.27 - Representação gráfica de L_{barreira} em função de L_{nominal} para : A) séries 1 e 2; B) séries 7 e 8.

Analisando os resultados, verifica-se que os parâmetros apresentam relações lineares para todas as séries de linhas apresentadas. A partir das expressões das retas de calibração é possível prever com precisão as dimensões finais das barreiras se o valor de L_{nominal} for conhecido. Na Tabela 4.2 podem observar-se os valores de difusão médios e regressões lineares para todas as séries de linhas estudadas.

Tabela 4.2 - Equações das retas de ajuste entre os parâmetros L_{barreira} (y) e L_{nominal} (x).

Série	d médio(μm)	Regressão linear	r^2
1	241,00 ± 26,90	$y = 1,5133x + 525,07$	0,9724
2	307,64 ± 50,02	$y = 1,4367x + 538,12$	0,98878
3	270,44 ± 33,62	$y = 1,3042x + 507,83$	0,9941
4	303,40 ± 46,60	$y = 1,4002x + 554,84$	0,9946
5	300,81 ± 38,65	$y = 1,3750x + 548,05$	0,9913
6	307,64 ± 79,50	$y = 1,6331x + 507,60$	0,9802
7	311,64 ± 43,72	$y = 1,4721x + 548,92$	0,9519
8	342,41 ± 62,34	$y = 1,6281x + 564,03$	0,9803

O declive das retas de ajuste está relacionado com a estabilidade do processo de difusão. Se a difusão for constante, a taxa de crescimento das linhas será também constante resultando numa reta de declive igual a um. Por outro lado se a difusão cresce com a dimensão nominal, como se verifica para as linhas, a taxa de crescimento das linhas é crescente o que resulta num declive superior a um. Observando a Tabela 4.2 verifica-se que os declives das retas de ajuste correspondentes às séries pares (120 s de aquecimento) são maiores que os das séries ímpares (60 s de aquecimento).

4.3.2.2 Barreiras circulares

De acordo com o que foi descrito anteriormente, esta parte do estudo foi realizada devido ao efeito da quantidade de cera dos padrões no processo de difusão. Por outro lado, devido ao objetivo de produzir os dispositivos com as dimensões das microplacas convencionais, foram calculadas as equações de ajuste para diâmetros de poços de dimensões entre 2 e 20 mm. No intervalo escolhido estão compreendidos os diâmetros de poço das microplacas de 24 (≈ 15 mm), 96 (≈ 5 mm) e 384 poços (≈ 3 mm).

Na Figura 4.28 pode observar-se uma série de poços antes e depois do processo de aquecimento. Como anteriormente, verifica-se que o reaquecimento dos padrões na placa de aquecimento causa difusão lateral da cera, alterando as dimensões finais das barreiras hidrofóbicas. No padrão apresentado os poços estão dispostos numa camada de cera uniforme, pelo que existe uma maior quantidade de cera do que aquela que esta presente nas linhas. Por outro lado, a camada uniforme de cera cria uma barreira contínua entre os poços, o que melhora a capacidade de isolamento de cada poço.

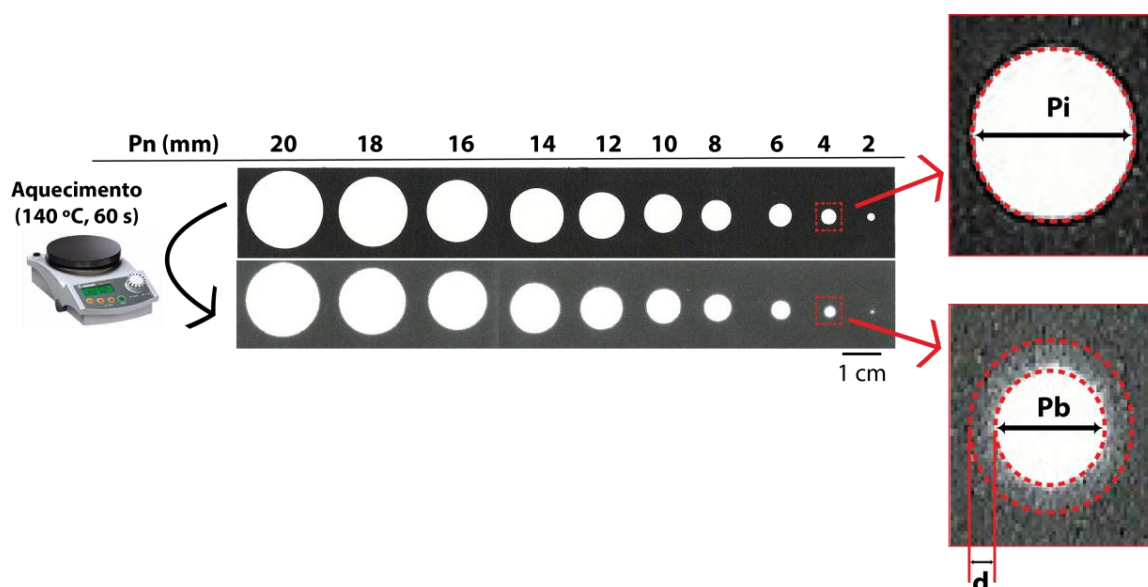


Figura 4.28 - Série de poços (2 - 20 mm) antes e após o processo de difusão.

Os valores de difusão calculados em função do diâmetro nominal dos poços estão representados graficamente na Figura 4.29. Os gráficos relativos aos valores de difusão das restantes séries de linhas podem ser consultados no Anexo 6

Contrariamente ao que se verificou na difusão lateral das linhas, o processo aparenta ser constante e independente da dimensão nominal do padrão. Os gráficos obtidos revelam pequenas oscilações no valor da difusão no entanto não apresentam a tendência crescente observada anteriormente.

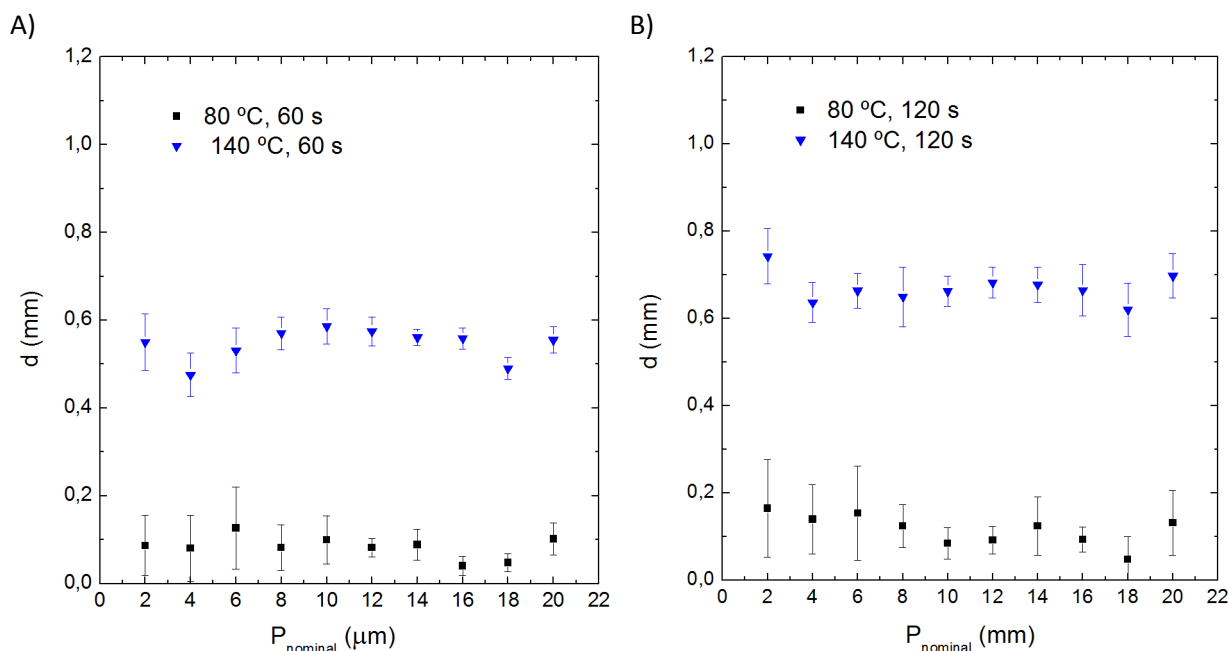
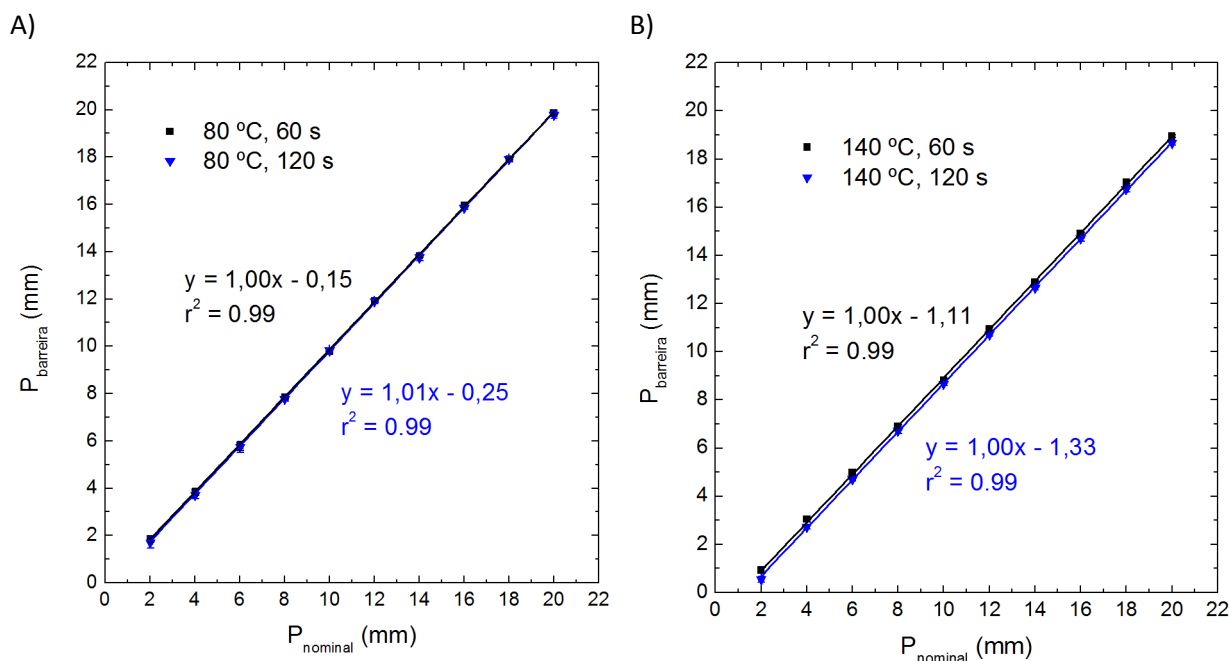


Figura 4.29 - Difusão em função do diâmetro nominal dos poços.

Na Figura 4.30 pode observar-se a representação gráfica do parâmetro P_{barreira} em função de P_{nominal} . Cada ponto do gráfico corresponde à média de cinco medidas independentes e as barras de erro representam o desvio padrão entre elas. Os gráficos correspondentes às restantes séries de linhas podem ser consultados no Anexo 7..


 Figura 4.30 - Representação gráfica de P_{barreira} em função de P_{nominal} para : A) séries 1 e 2; B) séries 7 e 8.

Analisando os resultados obtidos verifica-se que os parâmetros apresentam relação linear para as séries de poços apresentadas. De referir que as barras de erro são menores que o tamanho dos pontos do gráfico. No gráfico referente à temperatura de 80 °C as retas de ajuste estão

sobrepostas. As equações de ajuste e valores médios de difusão para todas as séries de poços podem ser consultadas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Equações das retas de ajuste entre os parâmetros P_{barreira} (y) e P_{nominal} (x).

Série	d médio (μm)	Equação	r^2
1	84,01, \pm 24,99	$y = 1,00x - 0,15$	0,99
2	114,84 \pm 35,60	$y = 1,01x - 0,25$	0,99
3	214,73 \pm 53,92	$y = 0,99x - 0,30$	0,99
4	373,54 \pm 61,78	$y = 1,00x - 0,77$	0,99
5	429,67 \pm 22,94	$y = 1,00x - 0,86$	0,99
6	570,71 \pm 33,61	$y = 1,00x - 1,14$	0,99
7	545,36 \pm 36,03	$y = 1,00x - 1,11$	0,99
8	669,24 \pm 33,78	$y = 1,00x - 1,33$	0,99

Analisando os dados obtidos, conclui-se que o processo de difusão é independente do diâmetro nominal do poço, na medida em que todas as equações de ajuste apresentam declive igual a um. Verifica-se também que os valores da difusão apresentam valores maiores do que aqueles que foram encontrados nas linhas. Esta discrepância pode ser explicada pela diferença na quantidade de cera depositada durante a impressão dos padrões.

De um modo geral verifica-se linearidade entre as dimensões nominais e finais dos padrões estudados. A linearidade entre os parâmetros representa uma vantagem no dimensionamento das microplacas, uma vez que permite prever com precisão as suas dimensões após o processo de difusão da cera. Deste modo é possível ajustar as dimensões nominais de acordo com as dimensões finais desejadas. As expressões obtidas neste estudo foram integradas numa folha de cálculo onde são inseridas as dimensões finais desejadas (diâmetro de poço, largura e altura da placa, etc.) e automaticamente calculadas as dimensões nominais correspondentes.

4.3.3 Resolução funcional do método

Medindo padrões de cera impressos na superfície do papel Whatman antes e depois do processo de difusão da cera, obtiveram-se relações entre os parâmetros que permitem prever as dimensões finais dos dispositivos. No entanto, essas expressões não fornecem informação acerca da eficácia das barreiras geradas pelas condições de difusão da Tabela 3.1.

Deste modo foi avaliada a eficácia de isolamento de padrões retangulares constituídos por barreiras em formato de linha. As dimensões nominais das linhas variam entre 100 e 700 μm , em intervalos de 100 μm . Foram produzidos 10 conjuntos destes padrões retangulares para cada série. No formato de barreiras circulares foi avaliada a eficácia de isolamento de uma matriz de 3x3 poços. O padrão utilizado neste estudo foi produzido de modo a reproduzir a disposição de poços de uma microplaca de 96 poços. Foi avaliada a capacidade de isolamento de 300 poços independentes.

Por outro lado foram também determinadas as dimensões mínimas das zonas hidrófilas delimitadas por barreiras em formato linha. Foram produzidos canais com largura nominal entre 500

e 1500 μm delimitados por barreiras com largura nominal de 400 μm , submetidas a uma temperatura de 140 °C durante 60 s. Para cada largura de canal foram avaliados 10 canais.

Para determinar o menor tamanho de poço funcional permitido pelo método de impressão a cera foram fabricadas barreiras circulares com diâmetros nominais entre 1 e 3,5 mm. As barreiras usadas neste estudo foram submetidas a uma temperatura de 140 °C durante 60 s.

4.3.3.1 Barreira hidrofóbicas

Na Figura 4.31 podem observar-se dois canais delimitados por barreiras de largura nominal de 400 μm , nos quais foram depositados 2 μL de uma solução aquosa de amaranth. No primeiro canal o corante foi depositado no papel antes do processo de difusão. Verifica-se que as barreiras não foram capazes de reter a solução. Nas secções de corte deste canal verificamos que as linhas de cera estão apenas na superfície do papel permitindo que a solução se desloque nas zonas em que não existe cera. O segundo padrão apresentado foi colocado na placa de aquecimento, a uma temperatura de 140 °C durante 60 s. Verificamos que este canal foi capaz de reter a solução dentro do espaço definido pelas barreiras de cera. Analisando as secções de corte confirma-se que a cera foi difundida em toda a espessura do papel, criando uma barreira impermeável.

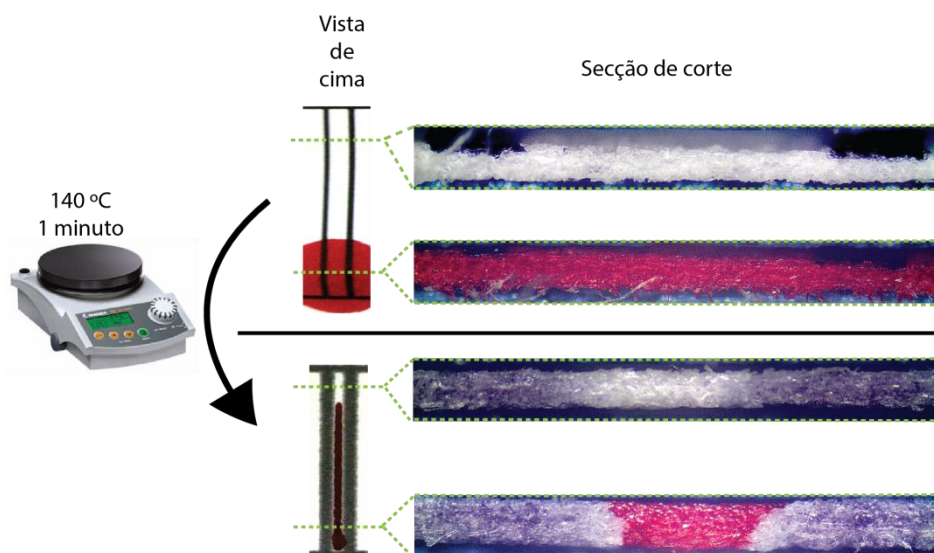


Figura 4.31 -Imagens e secções de corte de canais delimitados por linhas e barreiras hidrofóbicas.

Na Figura 4.32 estão representados os resultados obtidos na determinação da resolução funcional de barreiras em formato linha. Analisando a representação gráfica dos resultados verifica-se que a eficácia de isolamento das barreiras aumenta com o aumento da temperatura e tempo de aquecimento. Este resultado era esperado uma vez que se concluiu que a difusão da cera é diretamente proporcional a estes dois parâmetros (equação 1.1). Observa-se também que as linhas de menor largura nominal (100 e 200 μm) não originam barreiras hidrofóbicas funcionais para nenhuma das temperaturas e tempos de aquecimento estudados. A quantidade de cera depositada nestas linhas não é suficiente para gerar uma barreira hidrofóbica em toda a espessura do papel. Os dados mostram também que as temperaturas de 80 e 100 °C são insuficientes para criar barreiras hidrofóbicas isolantes para todas as larguras nominais de linha analisadas. Estes dois valores de temperatura não são suficientes para baixar a viscosidade da cera de tal modo que esta se difunda por toda a espessura da folha.

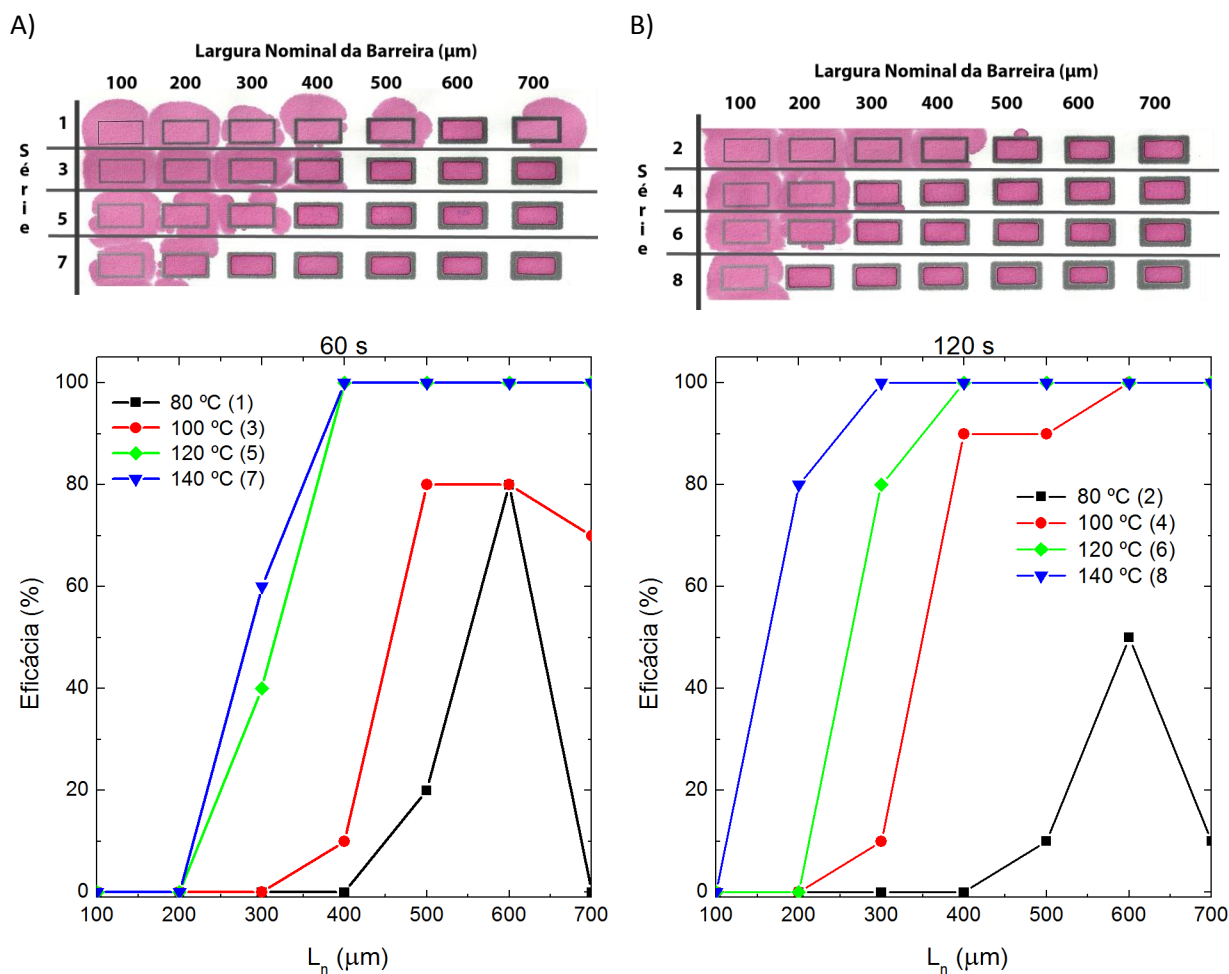


Figura 4.32 - Eficácia de isolamento das barreiras em forma de linha em função da sua largura nominal.

Na Figura 4.33 estão representados os resultados obtidos na avaliação da eficácia de isolamento de barreiras circulares.

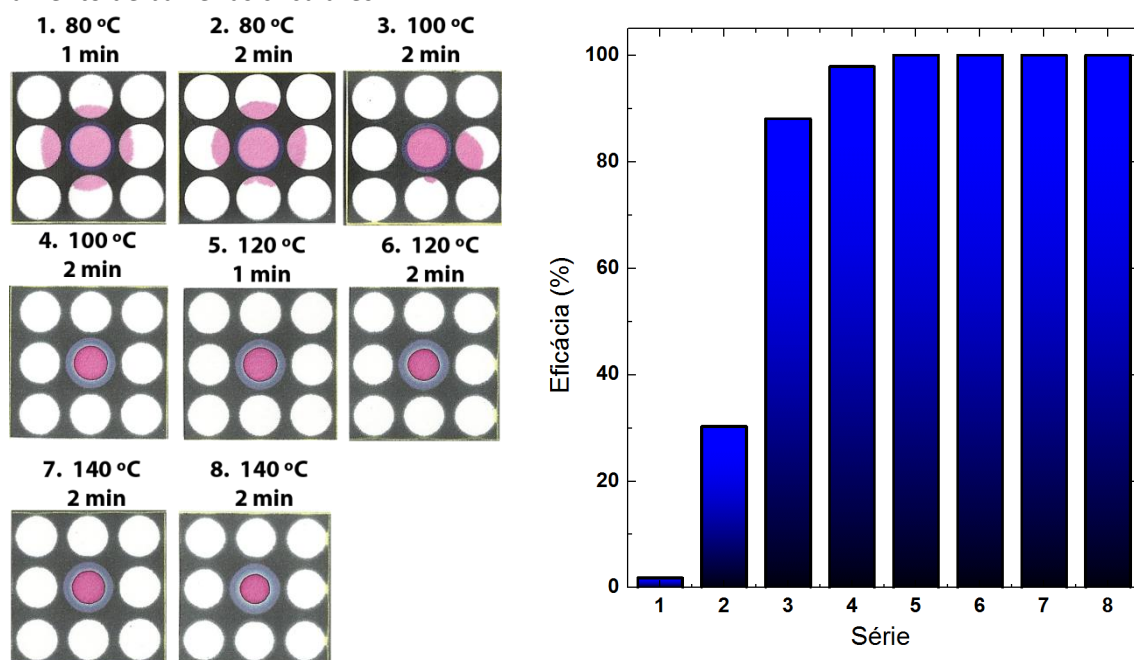


Figura 4.33 - Eficácia de isolamento de poços em função das condições de aquecimento

Analisando o gráfico conclui-se que apenas se obteve uma percentagem de 100% de barreiras eficazes para temperaturas maiores que 120 °C. Como foi referido anteriormente, temperaturas abaixo desse valor não permitem a difusão vertical da cera em toda a espessura da folha.

4.3.3.2 Zonas hidrófilas

Define-se um canal hidrófilo como a zona compreendida entre duas barreiras de cera isolantes. Devido à difusão lateral da cera, o recozimento dos dispositivos pode provocar o estrangulamento de canais necessários para a condução de soluções.

De acordo com os resultados obtidos no estudo da difusão da cera, uma linha de 400 μm origina uma barreira de 1150 μm quando submetida às condições de aquecimento utilizadas, o que corresponde a uma difusão de cerca de 750 μm . Uma vez que o canal é delimitado por duas barreiras, pelos modelos de difusão da cera sofrerá uma diminuição de 750 μm . Deste modo, é esperado que canais com dimensão nominal menor que 750 μm não sejam funcionais.

Na Figura 4.34 apresentam-se os resultados obtidos.

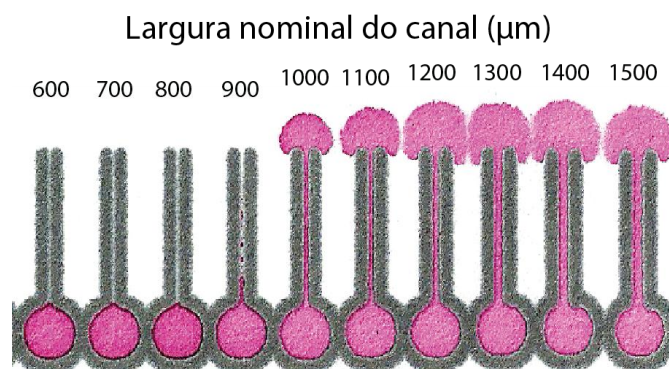


Figura 4.34 - Ilustração dos resultados do estudo de avaliação das dimensões nominais do menor canal hidrófilo funcional.

Os restantes resultados obtidos são consistentes com o padrão apresentado na figura, ou seja, verificou-se que todos os canais com dimensões nominais abaixo de 1000 μm não são funcionais após o processo de reaquecimento e que, para dimensões nominais maiores que esse valor todos os canais são funcionais. Como foi referido, devido à difusão lateral da cera, esperava-se uma diminuição da largura do canal na ordem dos 750 μm . Os resultados obtidos corroboram as previsões do modelo de difusão visto que nenhum canal com dimensão nominal menor ou igual esse valor se revelou funcional. Por outro lado, considerando que apenas se obtiveram canais funcionais com largura maior que 1000 μm , pode também concluir-se que canais com largura final (depois de aquecimento) inferior a 250 μm ($1000 - 750$) não são funcionais.

Do mesmo modo, determinaram-se também as dimensões nominais correspondentes ao menor poço hidrófilo funcional. Alguns resultados estão representados na Figura 4.35.

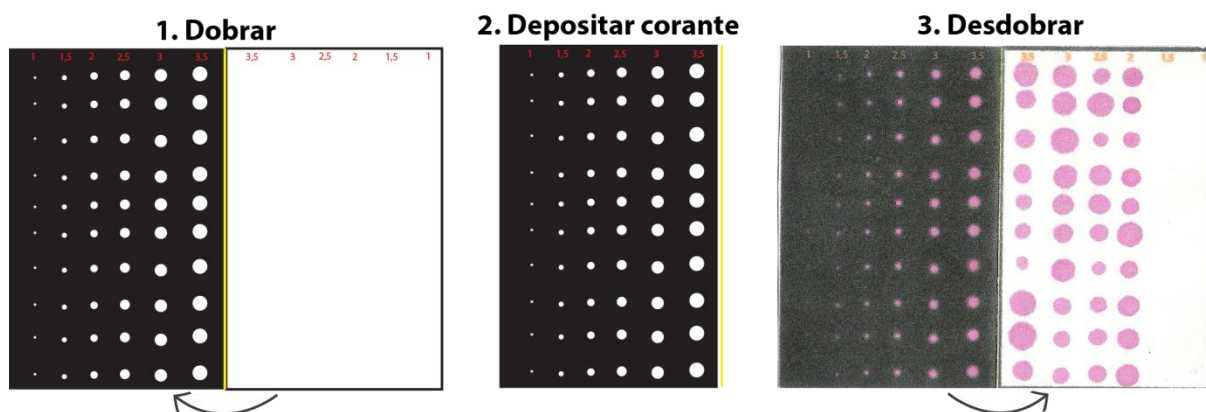


Figura 4.35 - Ilustração dos resultados do estudo de avaliação das dimensões nominais do menor poço hidrófilo funcional.

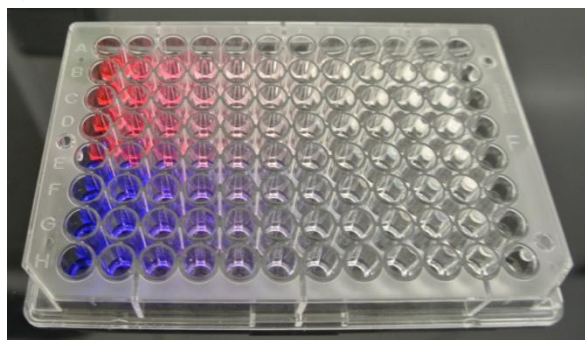
À semelhança dos resultados obtidos para o canal hidrófilo, este estudo apresentou resultados conclusivos e consistentes. Todos os poços com dimensão nominal menor que 1,5 mm não produziram barreiras circulares eficazes, e todos aqueles com dimensão nominal maior que esse valor originaram barreiras funcionais.

A difusão lateral representa também uma limitação no que diz respeito à resolução funcional do método de impressão a cera. Neste caso específico, limita a produção de microplacas ao formato de 384 poços, uma vez que não é possível garantir poços hidrófilos funcionais para formatos com densidades de poço maiores.

4.4 Sistema de leitura de resultados

A versatilidade das microplacas convencionais deve-se à sua compatibilidade com leitores de microplacas. Estes equipamentos são espectrofotômetros automatizados que reduzem o tempo de análise de ensaios realizados em microplaca. Deste modo, para destacar o valor associado às microplacas de papel como complemento ou alternativa às microplacas convencionais demonstra-se que são compatíveis com leitores de microplacas. No entanto, estes equipamentos têm um custo elevado e podem estar acessíveis em situações de escassez de recursos e/ou zonas isoladas. Deste modo, pretende mostrar-se com este trabalho que *scanners* comerciais e câmaras fotográficas podem ser utilizados como medidores de refletância para deteção de ensaios colorimétricos em microplacas de papel.

A)



B)

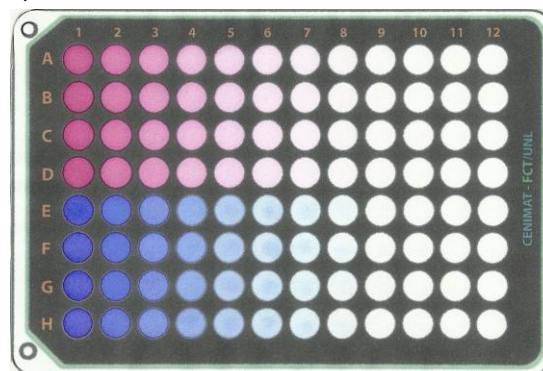


Figura 4.36 - Diluições seriadas de amaranço e azul Comassie em microplaca: A) de plástico e B) de papel.

As quantidades e concentrações de corante em cada poço das duas placas estão enumeradas na Tabela 3.2. Escolheu usar-se a mesma quantidade de corante para cada poço com coordenadas iguais nas placas de plástico e papel uma vez que as medições na placa de papel são feitas após a secagem do solvente e disposição do soluto pelas fibras do papel.

4.4.1 Espectrofotometria de absorvância (leitor de microplacas)

O comportamento das placas de papel com 96 poços em espectrofotometria de absorvância foi analisado usando dois corantes (amaranto e azul Comassie). Foram efetuadas medições com ambos os corantes em solução aquosa nas placas de plástico, e em fase sólida quando absorvidos pelas fibras de celulose nas placas de papel, como se pode verificar na Figura 4.36.

Na Figura 4.27 podem observar-se os espectros de absorvância dos corantes em microplaca de plástico e microplaca de papel. Os espectros de absorção demonstram que a microplaca de plástico é totalmente transparente, na medida em que o valor do poço branco é igual a zero para todos os comprimentos de onda analisados. Contrariamente o poço branco da microplaca de papel apresenta um elevado valor de absorvância, uma vez que a celulose apresenta um índice de refração superior ao do meio ($n_D=1,55$). A aplicação de óleo mineral ou outro líquido que torne o papel translúcido e ajude a diminuir as diferenças nos índices de refração pode aumentar a sensibilidade das medidas, diminuindo a absorção de fundo devido à placa de papel [10]. No entanto, a aplicação de óleo mineral representa um passo adicional nas análises e afeta negativamente as medições de refletância, pelo que não foi usada no âmbito deste trabalho.

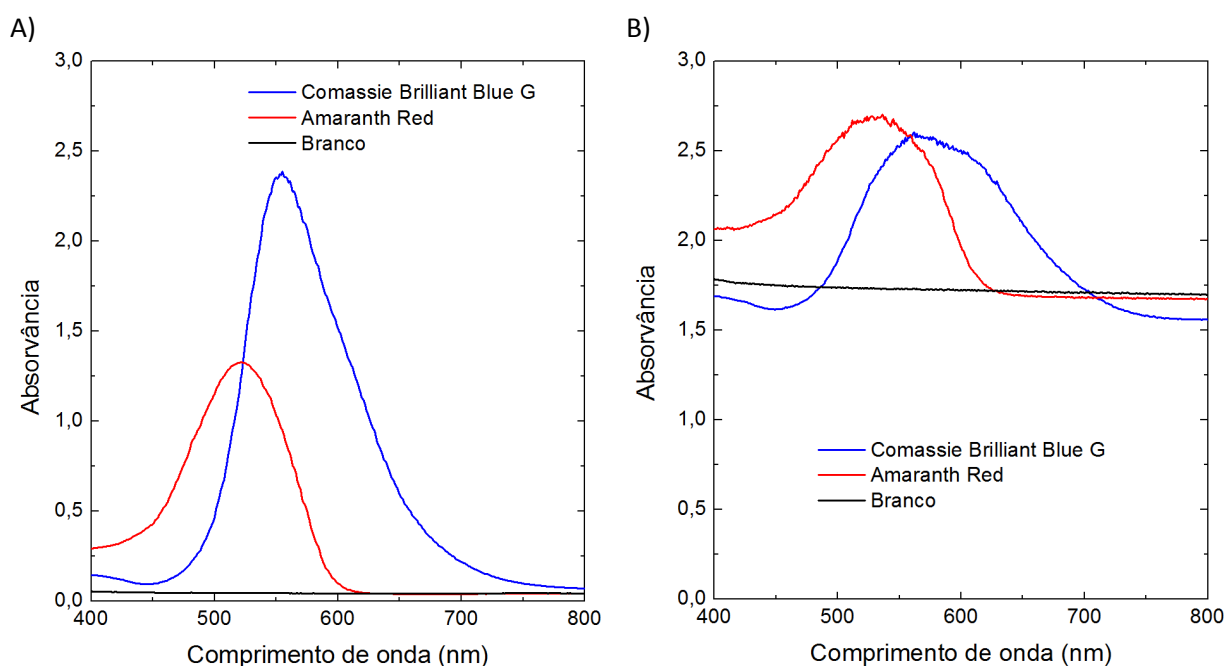


Figura 4.37 - Espectros de absorvância: A) Das soluções de ambos os corantes e de um poço branco da microplaca de plástico e B) dos corantes e poço branco da microplaca de papel.

A Figura 4.38 mostra as curvas de calibração obtidas para os dois corantes em ambas as plataformas. A escala logarítmica foi escolhida por clareza na demonstração dos resultados. Para calcular as curvas de calibração foram apenas utilizados os dados de medições dentro dos limites de

deteção determinados para cada plataforma. Cada ponto representa a média de 4 medições diferentes e as barras de erro o desvio padrão entre as medidas. O gráfico em escala linear com todos os pontos experimentais pode ser consultado no Anexo 8.

O tratamento dos resultados revelou que ambas as plataformas apresentam o mesmo comportamento com o aumento de quantidade de soluto. Todos os conjuntos de dados apresentam relação linear entre os logaritmos de absorvância e quantidade de soluto. Analisando os dados confirma-se que a sensibilidade das microplacas de papel é menor que na configuração tradicional. As retas de ajuste apresentam declives menores para a placa de papel e o intervalo de amplitude entre os valores correspondentes às concentrações mínima e máxima é significativamente menor. A diferença de sensibilidade da plataforma pode ser explicada tanto pelo curto percurso ótico ($\approx 180 \mu\text{m}$) como pelo elevado valor de fundo devido às fibras de celulose. Devido a este efeito o intervalo entre o branco (ausência de soluto) e o limite superior de deteção é menor, o que reduz a sensibilidade do sistema.

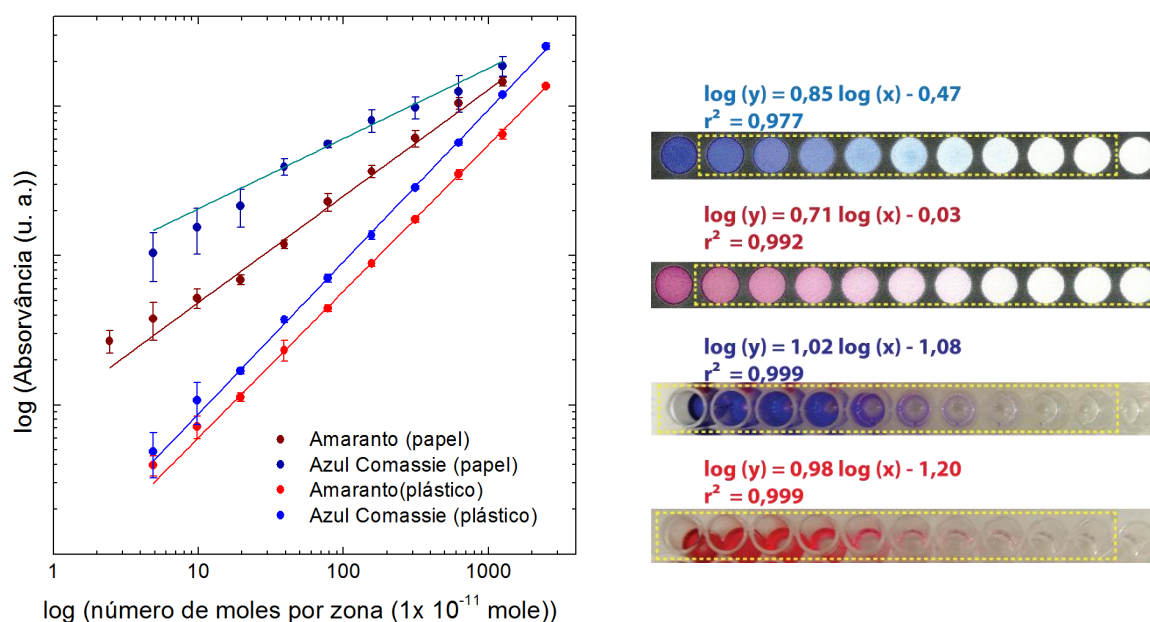


Figura 4.38 - Curvas de calibração para os corantes azul Comassie e amaranço em placas de papel e plástico. As regressões lineares foram calculadas no Origin 8.5.

Os limites inferiores de deteção da plataforma de plástico foram de 50 e 100 pico moles para o azul Comassie e amaranço, respetivamente. Para a placa de papel conseguiram medir-se quantidades até 50 pico moles de azul Comassie e 25 pico moles de amaranço. Ainda que a plataforma convencional apresente uma sensibilidade maior, as microplacas de papel requerem menos quantidade de solução por poço para desenvolvimento do sinal colorimétrico. Este efeito deve-se ao elevado rácio superfície/volume da matriz de fibras de celulose. Nas medições efetuadas na placa de papel os poços com as concentrações mais elevadas de ambos os corantes saturaram o detetor. Deste modo assume-se um limite superior de deteção de 250 nano moles para os dois corantes. Na configuração com placa de plástico nenhuma das concentrações saturou o detetor pelo que não foi possível determinar o seu limite superior de deteção.

As medições efetuadas permitem provar a compatibilidade das microplacas de papel com leitores de microplacas. Comparando os valores obtidos para os mesmos corantes em microplaca de

plástico e papel verifica-se que os valores de absorvância seguem a mesma tendência com a variação da quantidade de soluto.

A compatibilidade das microplacas com estes sistemas de detecção permite assim validar ensaios realizados em microplaca de papel. Por outro lado, comparando os resultados obtidos num sistema validado com os resultados das medições de refletância é possível avaliar a validade dessas medições.

4.4.2 Medições de refletância (esfera integradora e imagens digitais)

Na Figura 4.39 estão representados os espectros de refletância total obtidos num espectrofotómetro com esfera integradora, para os dois corantes em microplaca de papel. No Anexo 9 podem ser consultados os espectros de refletância em papel de filtro de café.

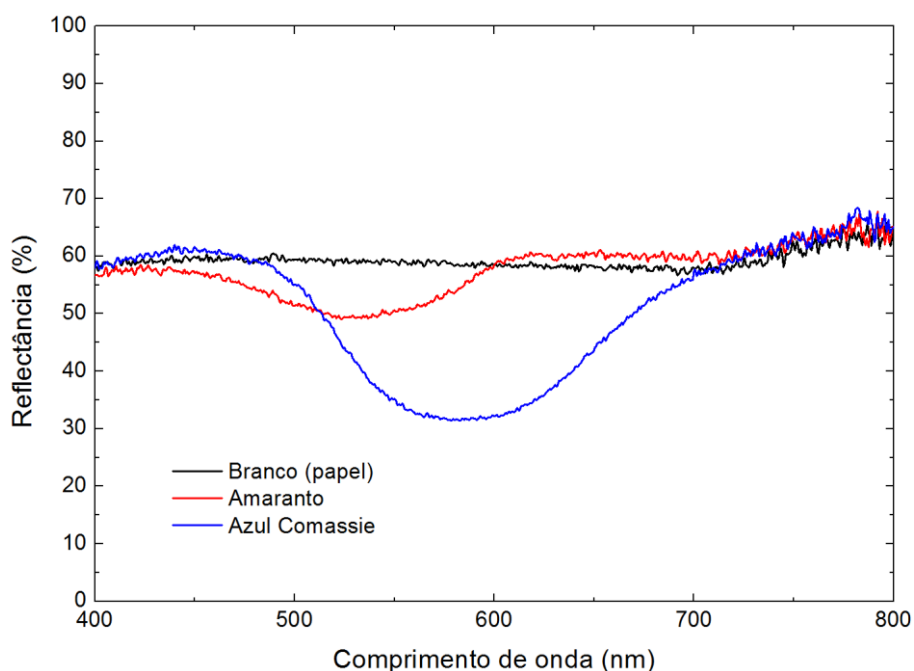


Figura 4.39 - Espectros de refletância dos dois corantes e de um poço branco da microplaca feita de papel de cromatografia Whatman Nº1.

Os espectros obtidos revelam que as microplacas de papel apresentam um comportamento favorável à quantificação por refletância. Considerando a equação 1.3, a refletância é medida a partir de uma referência totalmente refletora (sulfato de Bário, BaSO_4) e decai exponencialmente de acordo com a quantidade de soluto. Deste modo, o papel, visto que é branco apresenta o valor de refletância máximo em relação à referência para todos os comprimentos de onda. Nos comprimentos de onda de absorção do soluto a reflexão diminui consoante a sua quantidade. Analisando as diferenças na refletância para diferentes quantidades de soluto, é possível obter retas de ajuste para quantificação. Quantificação de concentração de soluto a partir da refletância está definida e apresenta instrumentação simples [10], [26], [27], [81], [82]. Os princípios físicos da refletância e aquisição de imagem por um *scanner* são essencialmente os mesmos. A refletância em qualquer superfície a um determinado comprimento de onda define a imagem e as cores adquiridas

no *scanner* ou na câmara fotográfica e essas imagens estão relacionadas com a composição química que define as cores da imagem [10].

No *software* Image J foi feita a análise da área correspondente aos poços da placa de papel no espaço colorimétrico RGB (*Red, Green, Blue*). O programa calcula a intensidade de cada pixel na área escolhida e retorna a média da intensidade de cada canal de todos os pixels. A escala RGB do programa de análise define valor máximo para a cor branca, ou seja o máximo para todos os canais. No âmbito deste trabalho, a cor branca representa a ausência de intensidade colorimétrica, uma vez que é a cor do suporte utilizado (papel). Deste modo a escala foi invertida de modo a que um aumento na quantidade de corante represente um aumento da intensidade colorimétrica.

Na Figura 4.40 estão representados os resultados obtidos através da análise das imagens digitalizadas no *scanner*. Cada ponto do gráfico corresponde à média de 4 poços independentes e as barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas. Novamente a escala logarítmica foi escolhida por melhor se adequar à apresentação dos resultados. Os mesmos gráficos em escala linear podem ser consultados no Anexo 10.

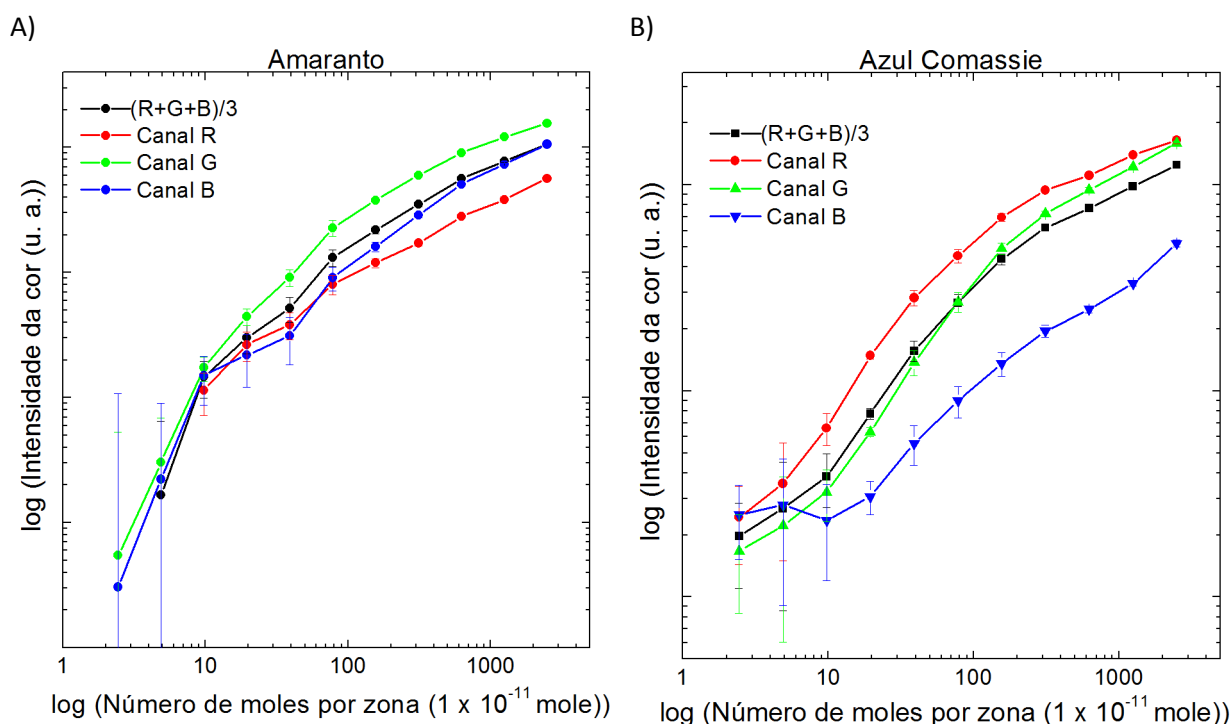


Figura 4.40 - Análise RGB das diluições dos corantes A) amaranth e B) azul Comassie.

Ambos os corantes apresentam relações entre a intensidade da cor e quantidade semelhantes àquelas que foram encontradas nas medições de absorvância. Observa-se um aumento na intensidade da cor com o aumento de moles de corante para todos os canais RGB. Os dados sugerem que uma escolha do canal deve ser feita dependendo da variação colorimétrica a analisar, uma vez que diferentes canais produziram diferentes resultados para os dois corantes. Os limites inferiores de deteção do sistema foram 25 e 50 pico moles para o azul Comassie e o amaranth, respetivamente. De referir que para elevadas quantidades de soluto o gráfico a curva de intensidade da cor aproxima-se de um limiar, o que indica a saturação do sistema de medição.

A análise RGB da imagem digital capturada pela câmara fotográfica revelou um comportamento semelhante ao que foi observado na análise da imagem do *scanner*. No entanto

usando este método de captura de imagens os limites inferiores de detecção revelaram-se substancialmente maiores (200 pico moles para ambos os corantes). A interferência das condições do meio, principalmente a luz desempenha um papel fundamental na sensibilidade e limites de operabilidade deste sistema. No entanto não foram feitos quaisquer estudos para controlo dessa variável.

Na Figura 4.41 apresentam-se as curvas de calibração para os canais com melhores resultados para os dois corantes, nos dois sistemas de captura das imagens. Cada ponto no gráfico é a média de 4 poços independentes e as barras de erro representam o desvio padrão entre as medidas.

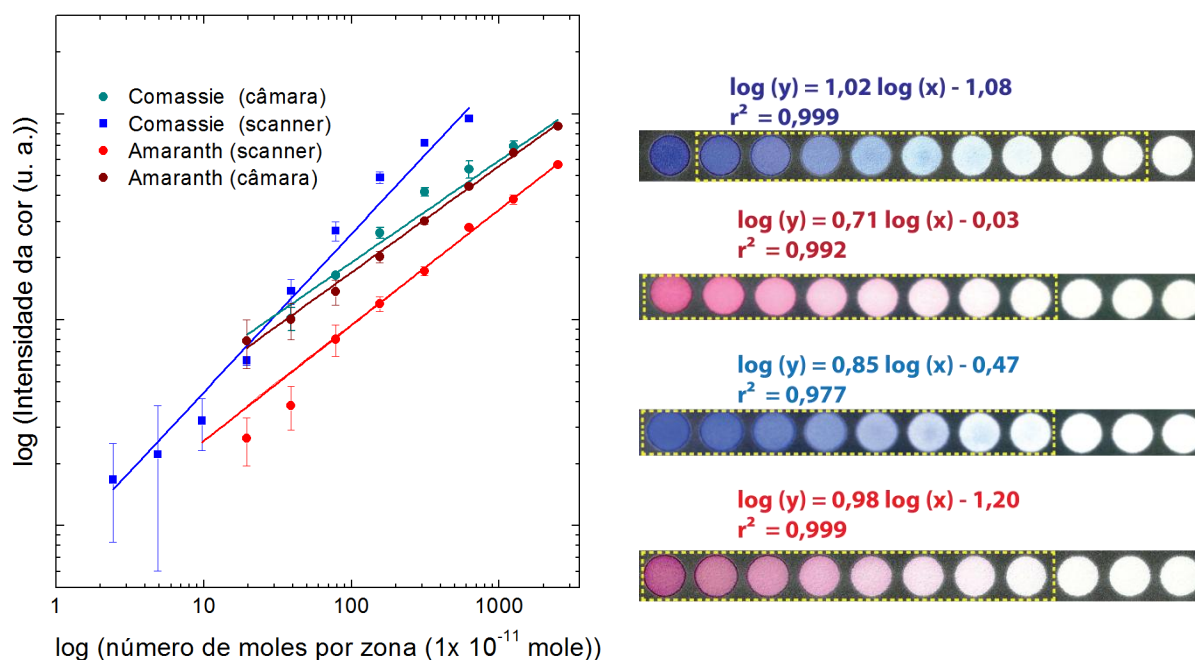


Figura 4.41 - Curvas de calibração de amaranth red e comassie blue para imagens capturadas por um scanner e por uma máquina fotográfica.

Os resultados obtidos permitem concluir que *scanners* e câmaras fotográficas podem ser utilizados como detetores de refletância para detecção e quantificação de analitos em microplacas de papel. O estudo provou também a compatibilidade das microplacas de papel com leitores de microplacas convencionais.

Deste modo antevê-se o uso de leitores de microplacas para confirmar e validar resultados de ensaios realizados em microplaca de papel num contexto laboratorial. Simultaneamente os sistemas de detecção por refletância revelam-se adequados para situações de escassez de recursos, uma vez que apenas necessitam de uma câmara fotográfica e uma aplicação de análise de cor.

4.5 Dispositivos de diagnóstico

4.5.1 Procedimento ELISA para diagnóstico de leishmaniose canina

O procedimento foi implementado em placas de papel com 96 poços (12x8) sem encapsulamento no verso. Uma vez que a frente e o verso da placa estão em desprotegidas, os poços podem ser lavados adicionando o tampão de lavagem pela frente da placa e pressionando um pedaço de papel absorvente no verso. O tampão atravessa a placa verticalmente até ao papel absorvente, carregando consigo os reagentes que não se encontram ligados. De modo a conter os reagentes nos poços usaram-se caixas de pontas de micropipetas para suportar a placa no decorrer do procedimento. Um volume de 3 μ L de qualquer reagente utilizado é suficiente para cobrir toda a área de um poço.

Escolheu fazer-se uma revelação colorimétrica de modo a que os resultados pudessem ser registados e analisados sem recurso a um leitor de microplacas que como foi referido, é um equipamento dispendioso. Vários pares enzima/substrato têm sido usados em ELISA convencional para produzir reações colorimétricas. Para este procedimento foi usada a enzima fosfatase alcalina (ALP) e o substrato BCIP/NBT uma vez que produz uma variação de cor de amarelo claro para roxo escuro, tendo um bom contraste com o papel (branco). Este sistema está extensivamente caracterizado e está disponível comercialmente uma vasta gama de anticorpos conjugados com esta enzima [83].

O ensaio desenvolvido compreende os passos ilustrados na Figura 4.42. O procedimento é indireto porque não avalia diretamente a presença do organismo causador da doença. Em vez disso o ensaio sinaliza a presença de anticorpos no soro do animal com afinidade para este parasita. A solução de antigénio é um lisado do promastigota que é imobilizado na zona de teste, sendo seguidamente adicionada uma solução de bloqueio aos poços de papel que visa reduzir a ocorrência de ligações não específicas com mesmos. É então adicionado o soro animal cujos anticorpos anti-*Leishmania* (se existirem) se vão ligar ao antigénio imobilizado na matriz de papel. A zona de teste é lavada, de modo a remover reagentes residuais e é adicionado anticorpo marcado com ALP. Este anticorpo tem afinidade para a parte comum de todos os anticorpos do cão e vai ligar-se aos anticorpos anti-*Leishmania* que ficaram imobilizados com o antigénio. É efetuada outra lavagem de modo a deixar no papel apenas os anticorpos que se encontram ligados aos locais de interesse e é adicionado o substrato da enzima. Deste modo, para a mesma quantidade de antigénio imobilizado a variação do sinal colorimétrico depende da quantidade de anticorpos anti-*Leishmania* presentes no soro do animal.

Os resultados obtidos estão representados no gráfico da Figura 4.43. Para desenvolvimento desta prova de conceito usou-se soro sanguíneo de dois animais (infetado e não infetado). A solução de controlo continha apenas o tampão de diluição do soro (PBS). Os resultados apresentados são a média dos cinco replicados feitos por cada ensaio e as barras de erro representam o desvio padrão

entre as medidas. Foi ainda realizada uma análise de variância (ANOVA) com teste de Tukey para comparação de médias.

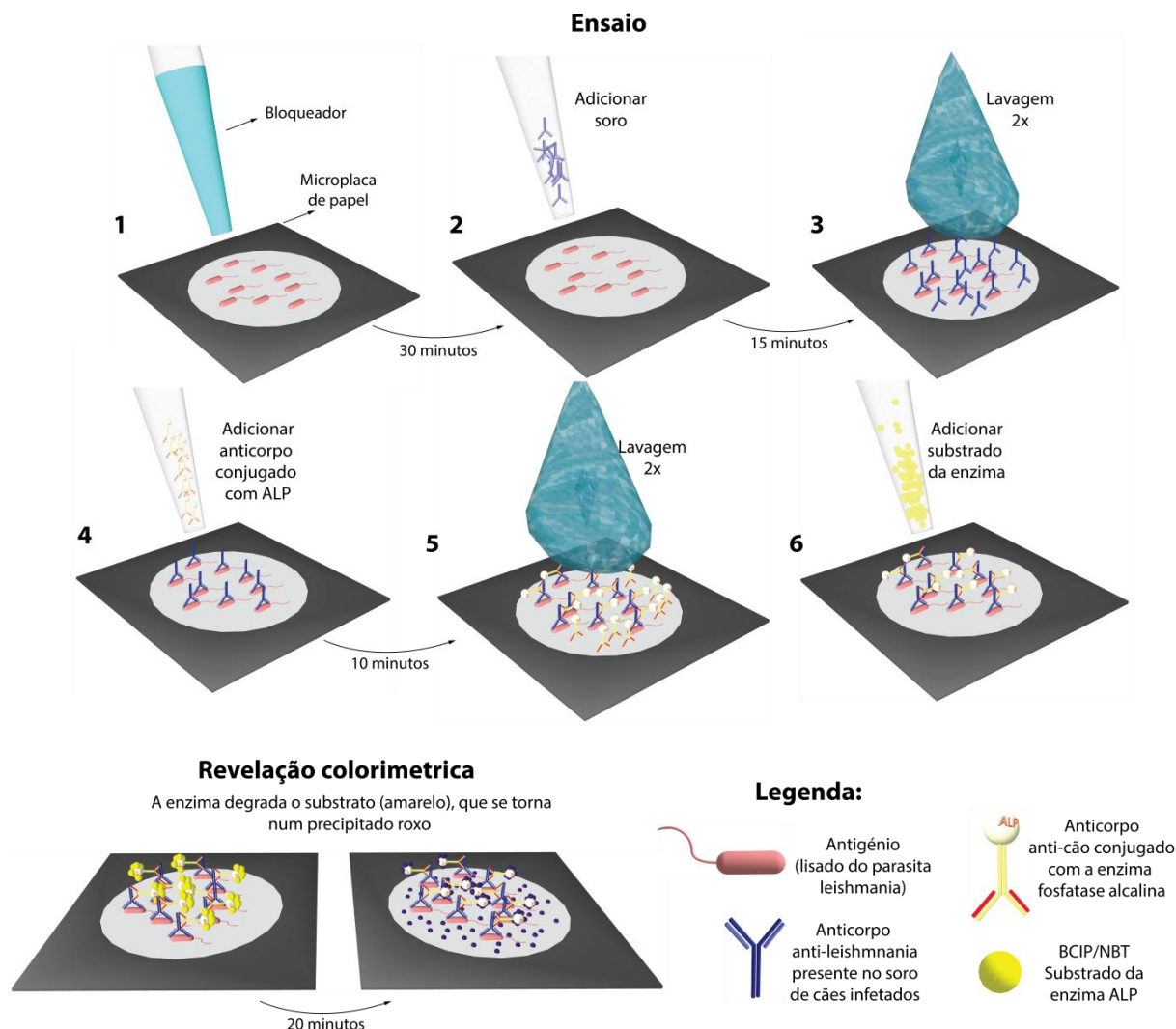


Figura 4.42 - Ilustração de um ensaio ELISA para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* (resultado positivo).

Analisando os resultados do ensaio colorimétrico por discriminação visual, é possível observar uma pequena variação na intensidade entre os três conjuntos de poços apresentados. As zonas de teste nas quais foi depositado soro de um animal infectado apresentam uma coloração mais escura que os restantes poços. Este resultado sugere que os anticorpos anti-*Leishmania* presentes neste soro se ligaram ao antígeno imobilizado provocando um aumento no número de anticorpos conjugados com enzima no momento da revelação. Como a quantidade de substrato de enzima foi igual em todos os ensaios conclui-se que o aumento do sinal colorimétrico se deve à presença de mais enzima (e anticorpos). É assim válido afirmar que o ensaio realizado tem a capacidade de detetar anticorpos anti-*Leishmania* no soro.

Na análise em Image J à imagem digital dos ensaios calculou-se a intensidade da cor através do *Mean Gray Value* dos pixéis correspondentes à área de cada poço. Existe uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre o conjunto de dados correspondentes a um soro positivo e os restantes. O dispositivo apresenta no entanto um elevado sinal para zonas de teste com soro negativo, o que ocasionalmente leva à ocorrência de falsos positivos.

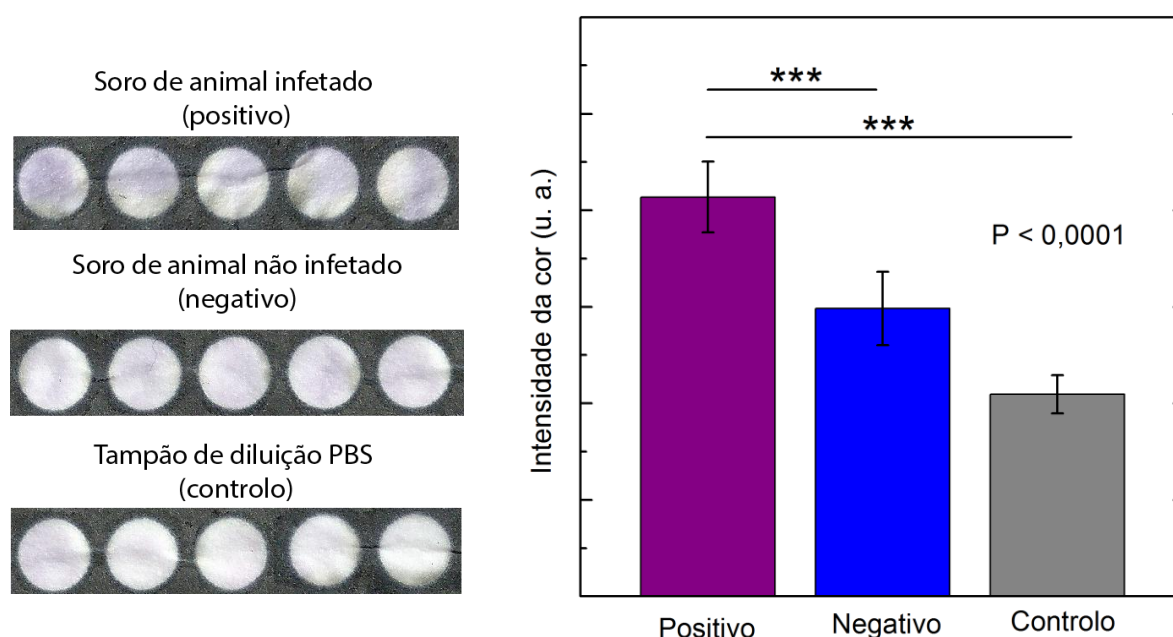


Figura 4.43 -A) resultados dos ensaios para soros positivo e negativo e solução de controle; B) análise de intensidade da cor por cada zona de teste. A análise estatística foi feita em Prism 5 Graph Pad, por meio de uma análise de variância (ANOVA) com teste de Tukey para comparação de médias; *** = $p < 0,0001$; $n=5$.

De facto este foi o maior obstáculo ao desenvolvimento do procedimento devido ao elevado número de variáveis a controlar. A solução de antígeno provém de um lisado do parasita que contém outras proteínas, o que pode provocar ligações inespecíficas. Pela mesma razão a concentração de antígeno na solução usada não é conhecida com rigor suficiente para conseguir reprodução dos resultados em grande escala. Por outro lado, o método de deposição dos reagentes (adsorção simples) não permite garantir a fixação de uma quantidade constante de antígeno em todos os poços como acontece em ensaios disponíveis no mercado. Não obstante, a nível conceptual o dispositivo apresenta resultados promissores. Mediante a otimização necessária para introduzir estas microplacas num *kit* de diagnóstico clinicamente validado, o dispositivo tem potencial para reduzir os custos e aumentar o rendimento em relação aos métodos usados atualmente. Os LFA (*Lateral Flow Assay*) convencionais de diagnóstico serológico permitem apenas a realização de um teste, ao passo que a microplaca de papel permite a realização de 96 ensaios em simultâneo.

A microplaca de papel revela ser uma plataforma adequada para este procedimento, providenciando um bom contraste e, devido ao seu elevado rácio superfície-volume facilita a evaporação do solvente, deixando o soluto concentrado e distribuído na rede de fibras do papel. Pela grande área de contacto entre os reagentes e o contraste com a cor branca do papel os tempos de realização do ensaio são reduzidos. A espessura do papel e a sua relativa opacidade permitem que os resultados sejam analisados num *scanner* comercial, dispensando o uso de um leitor de microplacas.

4.5.2 Plataforma de papel para detecção de tuberculose com nanopartículas de ouro - *Gold on paper* [37]

A plataforma Gold on paper foi desenvolvida nas microplacas de papel de 384 poços. Para desenvolver esta plataforma o método de detecção através de nanossondas de ouro foi otimizado para identificação específica de *DNA* de *M. tuberculosis* (membros MTBC). Uma nanossonda de ouro específica para o *locus rpoB* presente em todos os membros de MTBC foi sintetizada e otimizada de acordo com o método descrito por Batista et al [57], [84] (Figura 4.44).

As soluções de nanossondas de ouro exibem cor vermelha devido à ressonância plasmônica de superfície. Quando são induzidas a agregar por ação de sal (cloreto de magnésio), a presença de sequências alvo complementares evita a agregação das partículas e a solução permanece vermelha. A ausência da sequência e *DNA* alvo complementar resulta na agregação das nano partículas de ouro resultando numa solução com cor azul (Figura 4.44).

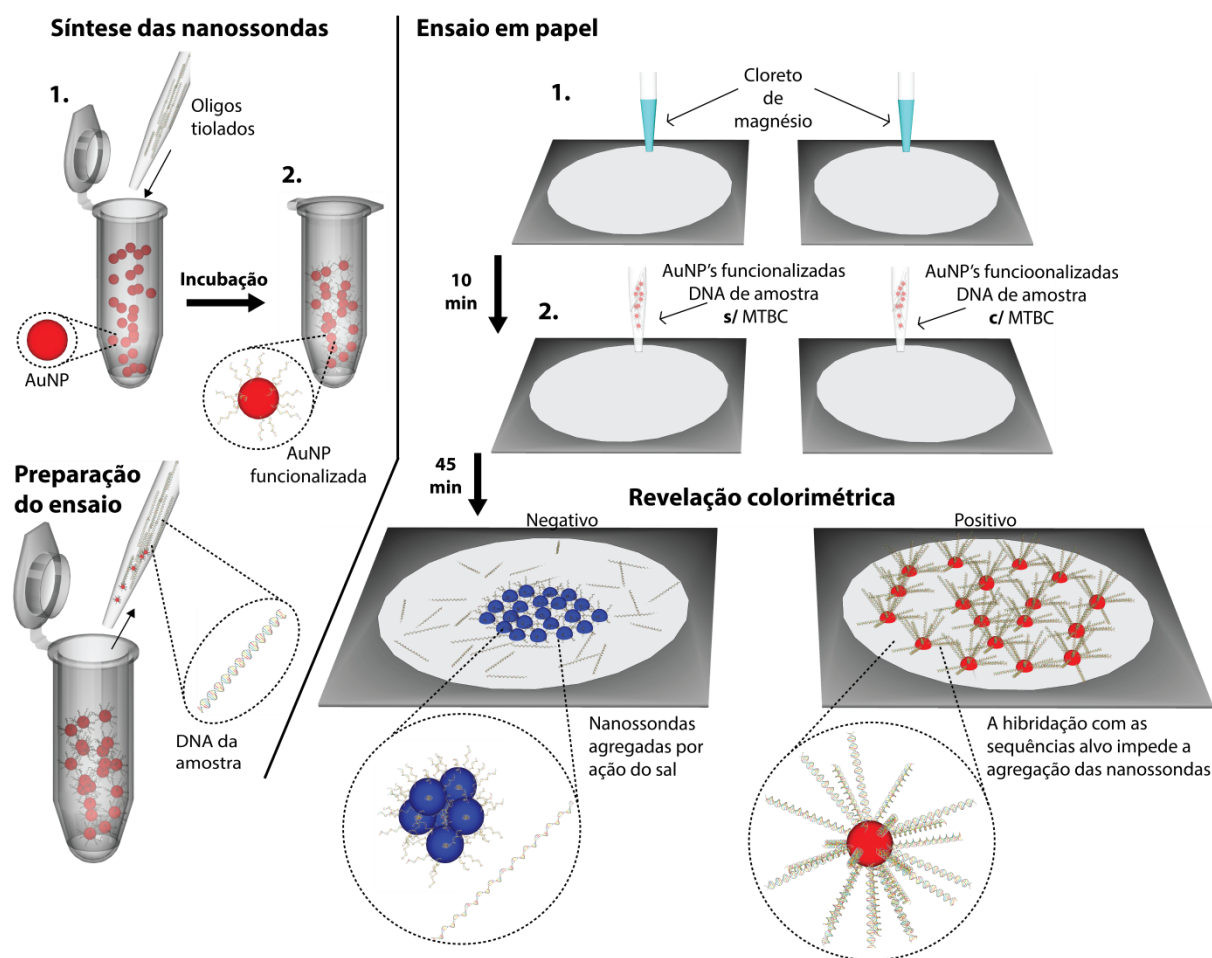


Figura 4.44 - Ilustração de um ensaio da plataforma Gold on paper (síntese das nanossondas, preparação e execução do ensaio em papel).

A análise de resultados (Figura 4.45) baseia-se no rácio entre as frações de nanossondas agregadas e não agregadas presentes na amostra. Por análise do espectro UV/visível dos poços após adição de sal foi calculado o rácio entre as absorvências a 526 nm (não agregadas) e a 600 nm (agregadas). O limiar que permite discernir uma amostra positiva de uma negativa corresponde a um

rácio de 1. Este rácio corresponde a um equilíbrio entre a quantidade de nanossondas agregadas e não agregadas, possibilitando a identificação de amostras com a sequência alvo.

Em cada poço da microplaca de papel foi impregnada a mínima quantidade de sal necessária para agregar as nanossondas no ensaio de calibração. As microplacas de papel são adequadas para operar com pequenos volumes, fornecendo resultados precisos na detecção de membros de MTBC usando volumes reduzidos (5 µL) permitindo uma redução de 6 vezes no volume total de nanossondas e amostra. Depois da hibridação da amostra a analisar com as nanossondas de ouro, 5 µL dessa solução foram depositados na placa de papel para desenvolvimento da cor. Depois de 45 min (tempo necessário à evaporação do solvente e estabilização da cor) uma imagem da placa foi capturada usando um smartphone e calculou-se o rácio entre os canais RGB vermelho e azul. Os dados foram diretamente analisados no dispositivo e enviadas via 3G para um computador portátil. As mesmas amostras foram analisadas num ensaio tradicional no leitor de microplacas (Figura 4.45).

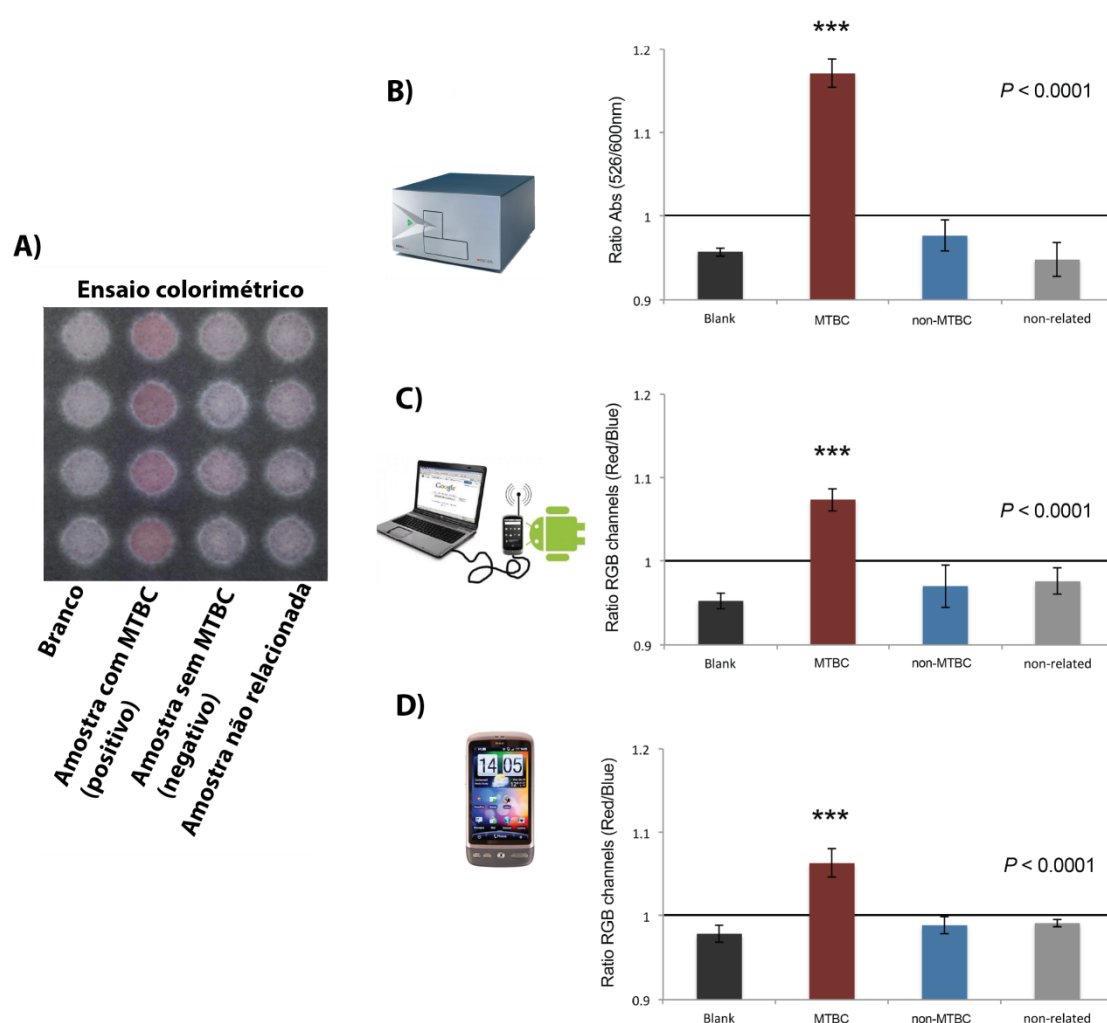


Figura 4.45 - Resultados do ensaio colorimétrico realizado em papel (A) e correspondentes análises RGB no software Image J (C) e na aplicação ColorPikr (D). O ensaio foi realizado paralelamente em solução e analisado num leitor de microplacas convencional (B). Análise de variância feita em Prism 5 Graph Pad com teste de Tukey para comparação de médias; *= $p < 0,0001$, $n=3$. Adaptado de [37].**

Para todas as metodologias o sistema de nanossondas de ouro revelou capacidade de identificação de DNA de *M.tuberculosis* ($p < 0,0001$) com pequenas variações entre os métodos e sem

perca de especificidade ou sensibilidade na análise realizada inteiramente no *smarthphone*. A plataforma é capaz de discriminar a presença de *DNA* de MTBC até concentrações de $10 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ (41 pmol de alvo na plataforma Gold on paper e 246 pmol no ensaio tradicional). O sistema desenvolvido apresenta no entanto sinais menores e uma diferença entre positivo e negativo menos intensa que o ensaio analisado no leitor de microplacas. Esta ligeira perca de sinal é compensada pela simplicidade do método de deteção sem perca de sensibilidade, dispensando o uso de um leitor de microplacas ou espectrofotómetro UV/visível.

Após realização do ensaio colorimétrico efetuou-se uma caracterização morfológica das amostras por SEM (Figura 4.46). Os resultados mostram uma diferença clara na difusão das nanossondas de ouro em ensaios positivos e negativos. Na presença de uma amostra com membros de MTBC o poço revela uma coloração vermelha e são visíveis nanossondas não agregadas dispostas na área analisada. A amostra negativa cujo poço tem coloração azul mostra agregação das nanossondas.

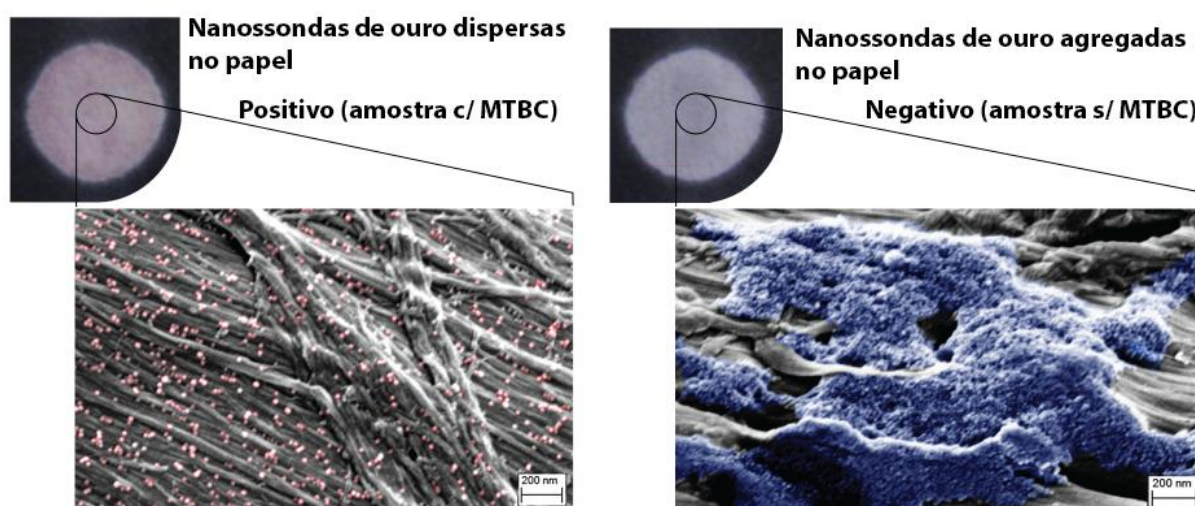


Figura 4.46 - Imagens SEM dos resultados da plataforma Gold on paper (coloração artificial em Adobe Photoshop).

Em trabalho efetuado após a publicação do artigo, foi realizada uma análise EDS a um poço correspondente a um resultado negativo da plataforma *Gold on paper*. Na Figura 4.47 estão representados os mapas EDS resultantes. A imagem SEM revela um agregado de nanossondas na superfície de uma fibra. Nos mapas EDS correspondentes à área da imagem é possível observar os elementos carbono e oxigénio, resultantes da fibra de celulose onde o ouro se encontra depositado. Os detetores revelaram também quantidades consideráveis de cloro e magnésio, resultado da solução de sal (MgCl_2) impregnada nos poços para induzir agregação das nano partículas. Por fim os mapas de distribuição de elementos permitem ainda identificar o elemento ouro nas zonas correspondentes aos agregados de nanossondas visíveis na imagem.

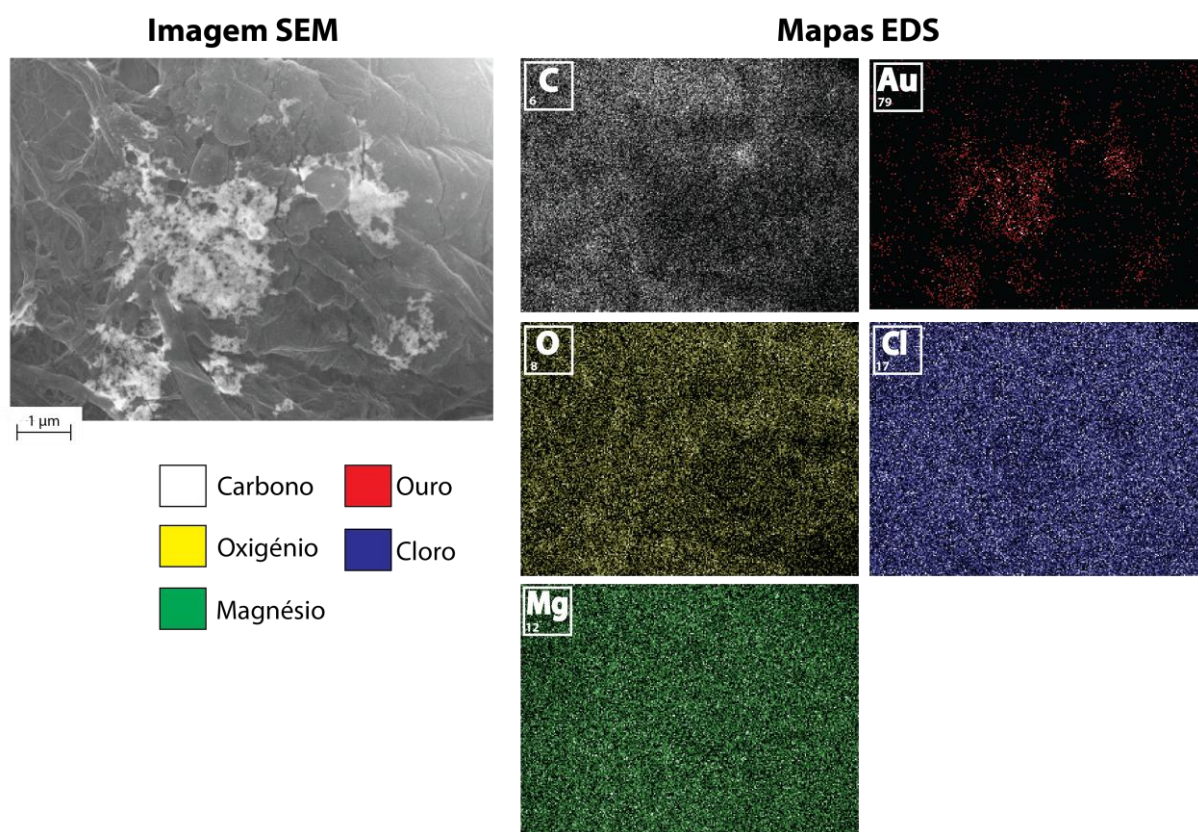


Figura 4.47 - Mapas de distribuição dos elementos de um poço da plataforma *Gold on paper* com um resultado negativo (nanossondas agregadas)

Baptista et al. estimou o custo dos reagentes por amostra para o método convencional [60]. Tendo em conta que o método *Gold on paper* permite a redução dos reagentes de 30 µL para 5 µL, ou seja utiliza apenas um sexto do volume necessário para o método convencional, infere-se também a redução do custo dos reagentes para um sexto. Nesse caso, e incluindo o custo do papel (127,9 x 85,85 mm²) e da impressão, calculou-se que o custo por teste seja de 0,06 €.

Capítulo 5

Conclusões e perspectivas de trabalho futuro

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de conjugar as vantagens da microfluídica em papel com a instrumentação de manuseamento e leitura de resultados específicos para microplacas, existentes na maioria dos laboratórios modernos.

5.1 Substratos e material de impressão

O papel é um material comum nos laboratórios em procedimentos de cromatografia e filtração., sendo inclusivamente usado em microplacas com sistemas de filtração integrados. Neste sentido, a familiaridade com o material em procedimentos laboratoriais facilita a integração das microplacas de papel num contexto laboratorial. Por outro lado, as características deste material permitem produzir dispositivos que satisfazem as diretivas da OMS, sumarizadas no acrónimo ASSURED.

O papel de cromatografia Nº1 foi o substrato usado na produção das microplacas, uma vez que a sua caracterização revelou as propriedades necessárias à aplicação dos conceitos de microfluídica. Por outro lado, o trabalho desenvolvido por outros autores revela que este é o substrato de referência no que diz respeito a aplicações de microfluídica. Deste modo, a sua caracterização química revelou uma composição maioritariamente celulósica com resíduos vestigiais de cálcio na análise EDS. As quantidades vestigiais deste elemento podem resultar do processo de branqueamento da pasta de papel. A caracterização morfológica e ângulo de contacto demonstraram que apresenta elevada porosidade e capacidade de absorção. No âmbito deste trabalho, esta propriedade é essencial na medida em que a maioria das reações em meio biológico ocorrem em solução aquosa.

Além do papel Whatman foram caracterizados três papéis diferentes, com o objetivo de avaliar as suas propriedades e determinar se são adequados para a produção de microplacas. A sua caracterização morfológica e ângulo de contacto determinaram que os papéis de impressão (branco e reciclado) não possuem a porosidade e capacidade de absorção necessárias na perspetiva do trabalho. O papel de filtro de café revelou uma morfologia semelhante à do papel Whatman e um ângulo de contacto de 18,3°, pelo que se apresenta como uma alternativa. A caracterização química permitiu confirmar a presença de compostos minerais nos papéis de impressão e a composição maioritariamente celulósica do papel de filtro de café.

Na perspectiva de desenvolvimento da tecnologia seria benéfico estabelecer parcerias com indústrias de produção de papel, no sentido de investigar e modificar as propriedades do papel de acordo com a aplicação a desenvolver. A aplicação de papel em microfluídica é uma técnica recente, pelo que não existem ainda canais de comunicação estabelecidos que permitam a interação com a indústria do papel no sentido de desenvolver substratos com características específicas.

5.2 Método de produção

A difusão lateral da cera, processo inerente à criação de barreiras hidrofóbicas no papel, altera a dimensão dos dispositivos. Deste modo foi avaliada a difusão da cera, no sentido de obter relações matemáticas entre as dimensões nominais (introduzidos no programa de desenho) e dimensões finais dos dispositivos (após difusão e criação de barreiras). Os resultados obtidos foram integrados numa folha de cálculo e ajudaram a dimensionar as microplacas de papel com as dimensões padrão. Foi também avaliada a resolução funcional do método de produção, ou seja, o valor nominal mínimo de um parâmetro ou conjunto de parâmetros a partir do qual se obtêm barreiras hidrofóbicas e zonas hidrófilas funcionais. Dos estudos efetuados ao processo de difusão concluiu-se que as combinações de aquecimento das séries 6, 7 e 8 permitem a criação de barreiras hidrofóbicas e zonas hidrófilas em 100% dos dispositivos. Deste modo, a maioria das microplacas foi produzida com 140 °C / 60 s (série 7), uma vez que minimiza o tempo de produção. Não obstante, podem ser usadas outras combinações de temperatura e tempo de difusão, de acordo com o equipamento usado e tipo de dispositivo.

O método de produção por impressão a cera revelou ser adequado para produção de microplacas de papel, permitindo a produção de microplacas de papel com dimensões dentro dos padrões estabelecidos. Deste modo as microplacas de papel são compatíveis com instrumentação específica para estes formatos. Pipetas com vários canais permitem depositar soluções em todos os poços de uma coluna em simultâneo, equipamentos mais complexos permitem realização de ensaios totalmente automatizados, reduzindo o tempo de realização e os erros associados ao utilizador. Por outro lado são também compatíveis com leitores de microplacas, equipamentos de referência para analisar resultados de ensaios em microplaca.

No sentido de otimizar o método de produção como perspectivas para trabalho futuro sugere-se a aplicação dos modelos de difusão a cera obtidos num *software* de desenho que permita projetar os padrões com as dimensões finais e imprimi-los com as dimensões nominais correspondentes.

5.3 Sistema de leitura de resultados

O desenvolvimento e validação de um sistema de leitura de resultados adaptado às microplacas de papel é essencial para potenciar a sua versatilidade. Neste contexto foi realizado um estudo inicial relacionando um método de deteção validado (leitor de microplacas) com um método alternativo de baixo custo adequado às características das microplacas desenvolvidas.

As microplacas de papel demonstraram ser compatíveis com medições de absorvância em comprimentos de onda visíveis num leitor de microplacas convencionais. No entanto devido às fibras de celulose da microplaca regista-se um elevado valor de *background*, o que reduz consideravelmente a sensibilidade do sistema. Não obstante, os resultados obtidos revelam que as microplacas de papel pode ser usada em medições de absorvância, uma vez que para quantidades variáveis de soluto, apresentam o mesmo comportamento que microplacas convencionais. As

medições de refletância por imagens digitais revelam que estas podem ser utilizadas para quantificar quantidades de soluto em microplacas de papel de uma forma rápida, económica, acessível e prática. Neste trabalho foram utilizadas duas ferramentas de aquisição de imagem (câmara fotográfica e scanner), cujas imagens foram analisadas no espaço colorimétrico RGB. No entanto, a complexidade das escalas colorimétricas e variedade de sistemas colorimétricos existentes, exigem um estudo mais aprofundado, de modo a determinar os espaços colorimétricos adequados para cada ensaio de acordo com a variação de cor.

Numa perspetiva de melhorar este sistema de análise de resultados seria interessante desenvolver aplicações para *smarthphone* e computador que permitissem reduzir o tempo e erros associados a estas medições. O utilizador seleccionaria quais os poços a analisar e o software analisaria automaticamente a área correspondente a esses poços, retornando os valores de intensidade colorimétrica do poço nos espaços colorimétricos desejados.

5.4 Aplicações

Muito esforço tem sido empregue no sentido de providenciar plataformas de diagnóstico, particularmente de doenças generalizadas e epidemias, portáteis e robustas para aplicação em situações de carência de recursos e/ou pessoal especializado. Os procedimentos de diagnóstico desenvolvidos em microplacas de papel revelaram resultados promissores e antevêem uma miríade de aplicações compatíveis com estas plataformas.

O ensaio ELISA para diagnóstico de leishmaniose canina revelou especificidade e sensibilidade suficientes para detetar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* em soros de animais infetados pela doença, a partir de medições de refletância. No entanto, a dificuldade em reproduzir os resultados exige a otimização de um método de fixação do antigénio à microplaca de papel. Numa perspetiva de trabalho futuro será importante desenvolver e otimizar novos métodos de fixação e desenvolver ensaios ELISA para diagnóstico de outras patologias.

Neste trabalho demonstra-se o potencial da plataforma *Gold on paper* para diagnóstico molecular de tuberculose. A plataforma *Gold on paper* opera no conceito de integrar um esquema de deteção molecular baseado em nanossondas de ouro numa microplaca de papel. Os dispositivos detetaram eficientemente membros de MTBC e por via de um *smarthphone* os dados foram analisados sem perda de sensibilidade e especificidade.

O conceito dos dispositivos desenvolvidos possibilita a realização de ensaios serológicos e moleculares de bio reconhecimento e deteção, transmitindo a informação digital por canais de comunicação existentes. Indexando a cada imagem digital informação geográfica, os sistemas de diagnóstico podem enviar a informação para um servidor central, permitindo a monitorização em tempo real das patologias.

Bibliografia

- [1] Nawracala et all., "Microtiter plate," U.S. Patent 60183882000.
- [2] P. Banks, "The microplate market past, present and future microplates today – the global market," *Drug Discovery World*, 2009.
- [3] R. T. Sherman, "Necessity is the mother of invention.," *Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)*, vol. 134, no. 1, p. 104, Jan. 1999.
- [4] "microplaca 96." [Online]. Available: <http://www.edgebio.com/products/96-well-treated-microplates-u-bottom-50063>.
- [5] "microplaca 384." [Online]. Available: <http://www.medicaexpo.com/prod/porvair-sciences/384-well-microplates-78492-489272.html>.
- [6] M. E. R. M. W. Briggs, "Microplates and Automation – An Interesting Relationship," p. 14831.
- [7] P. Microplates, "A Complete Overview."
- [8] "leitor microplacas." [Online]. Available: http://www.pharmaceutical-int.com/gallery/microplate-readers/absorbance-microplate-reader_01.html.
- [9] "Manuseamento microplacas." [Online]. Available: <http://news.directindustry.com/press/ibs-integra-biosciences/multipurpose-liquid-handling-instrument-39224-358211.html>.
- [10] E. Carrilho, S. Phillips, and S. Vella, "Paper microzone plates," *Analytical*, 2009.
- [11] N. Correia, "Produção e caracterização de dispositivos electrocrómicos em substratos à base de celulose," FCT/UNL, 2008.
- [12] J. L. Velho, *Mineral fillers for paper why, what, how*, First edit. Tecnicelpa, 2003.
- [13] J. C. Roberts, *The Chemistry of Paper*. The Royal Society of Chemistry, 1996, p. 190.
- [14] "Celulose na parede celular." [Online]. Available: http://www.mhhe.com/biosci/pae/botany/botany_map/articles/article_30.html.
- [15] P. Garside and P. Wyeth, "Identification of Cellulosic Fibres by FTIR Spectroscopy," vol. 48, pp. 269–275, 2003.
- [16] R. Pelton, "Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 28, no. 8, pp. 925–942, Sep. 2009.
- [17] "www.paperonweb.com." [Online]. Available: <http://www.paperonweb.com/grade.htm>. [Accessed: 22-Sep-2012].
- [18] T. Lappalainen, T. Teerinen, P. Vento, L. Hakalahti, and T. Erho, "Cellulose as a novel substrate for lateral flow assay," vol. 25, no. 4, pp. 536–550, 2010.
- [19] X. Li, D. R. Ballerini, and W. Shen, "A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends," *Biomicrofluidics*, vol. 6, no. 1, pp. 11301–1130113, Mar. 2012.
- [20] G. M. Whitesides, "The origins and the future of microfluidics.," *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 368–73, Jul. 2006.
- [21] H. Bruus, *Theoretical Microfluidics*. New York: Oxford University Press Inc., 2008.
- [22] L. A. Oliveira and A. G. Lopes, *Mecânica dos Flúidos*, 2.^a Edição. Lisboa, Portugal: LIVRIMPOR - Livros Técnicos, Lda., 2007.
- [23] E. W. Washburn, "The dynamica of Capillary flow," *Physical Review*, vol. 17, no. 3, pp. 273–283, 1921.

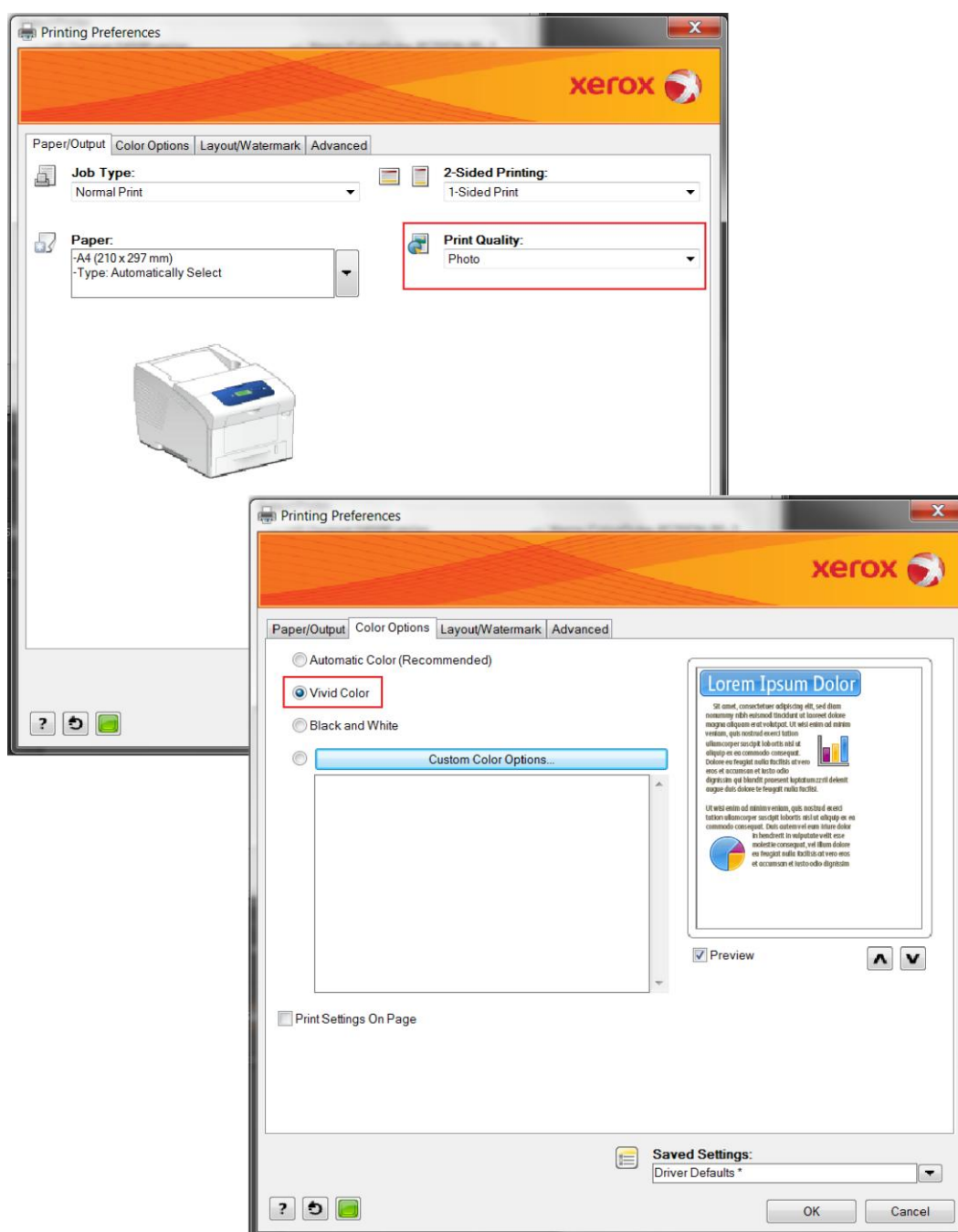
- [24] S. Upstone, "Ultraviolet/Visible Light Absorption Spectrophotometry in Clinical Chemistry," *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, pp. 1699–1714, 2006.
- [25] Thermo Fisher Scientific, "Basic UV-Vis Theory, Concepts and Applications."
- [26] A. Castro, L. Labaki, and R. Caram, "Medidas de refletância de cores de tintas através de análise espectral," *Ambiente ...*, no. 16, pp. 69–76, 2008.
- [27] F. a. a. Matias, M. M. D. C. Vila, and M. Tubino, "A simple device for quantitative colorimetric diffuse reflectance measurements," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 88, no. 1, pp. 60–66, Jan. 2003.
- [28] a Ghauch, C. Turnar, C. Fachinger, J. Rima, a Charef, J. Suptil, and M. Martin-Bouyer, "Use of diffuse reflectance spectrometry in spot test reactions for quantitative determination of cations in water.," *Chemosphere*, vol. 40, no. 12, pp. 1327–33, Jun. 2000.
- [29] A. Gardner, C. Tchou, T. Hawkins, and P. Debevec, "Linear light source reflectometry," *ACM Transactions on Graphics*, vol. 22, no. 3, p. 749, Jul. 2003.
- [30] C. S. Duarte, "Relatório Final de Estágio Mestrado Integrado em Medicina Veterinária 'LEISHMANIOSE: QUE FUTURO NOS RESERVA?' Cláudia Silva Duarte," 2009.
- [31] WHO, "Leishmaniasis," 2012. [Online]. Available: <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>. [Accessed: 19-Sep-2012].
- [32] F. Chappuis, S. Sundar, A. Hailu, H. Ghalib, S. Rijal, R. W. Peeling, J. Alvar, and M. Boelaert, "Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?," *Nature reviews. Microbiology*, vol. 5, no. 11, pp. 873–82, Nov. 2007.
- [33] a Voller, a Bartlett, and D. E. Bidwell, "Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques.," *Journal of clinical pathology*, vol. 31, no. 6, pp. 507–20, Jun. 1978.
- [34] J. Tian, X. Li, and W. Shen, "Printed two-dimensional micro-zone plates for chemical analysis and ELISA.," *Lab on a chip*, vol. 11, no. 17, pp. 2869–75, Sep. 2011.
- [35] H. Zhang, S. Wang, and G. Fang, "Applications and recent developments of multi-analyte simultaneous analysis by enzyme-linked immunosorbent assays.," *Journal of immunological methods*, vol. 368, no. 1–2, pp. 1–23, May 2011.
- [36] C. Maia, M. Nunes, J. Cristóvão, and L. Campino, "Experimental canine leishmaniasis: clinical, parasitological and serological follow-up.," *Acta tropica*, vol. 116, no. 3, pp. 193–9, Dec. 2010.
- [37] B. Veigas, J. M. Jacob, M. N. Costa, D. S. Santos, M. Viveiros, J. Inácio, R. Martins, P. Barquinha, E. Fortunato, and P. V. Baptista, "Gold on paper-paper platform for Au-nanoprobe TB detection.," *Lab on a chip*, Sep. 2012.
- [38] M. Larginho and P. V Baptista, "Gold and silver nanoparticles for clinical diagnostics - From genomics to proteomics.," *Journal of proteomics*, vol. 75, no. 10, pp. 2811–23, Jun. 2012.
- [39] B. M. R. Veigas, "Au-Nanossondas Aplicação na detecção de Mycobacterium tuberculosis e Plasmodium berghei," Universidade Nova de Lisboa Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2009.
- [40] L. M. Liz-Márzan, "Tailoring Surface Plasmons through the Morphology and Assembly of Metal Nanoparticles," *Langmuir*, no. 22, pp. 32–41, 2006.
- [41] P. K. Jain, K. S. Lee, I. H. El-Sayed, and M. a El-Sayed, "Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine.," *The journal of physical chemistry. B*, vol. 110, no. 14, pp. 7238–48, Apr. 2006.
- [42] C. S. Thaxton, D. G. Georganopoulou, and C. a Mirkin, "Gold nanoparticle probes for the detection of nucleic acid targets.," *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, vol. 363, no. 1–2, pp. 120–6, Jan. 2006.
- [43] P. Baptista, E. Pereira, P. Eaton, G. Doria, A. Miranda, I. Gomes, P. Quaresma, and R. Franco, "Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods.," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 391, no. 3, pp. 943–50, Jun. 2008.
- [44] "au nanossondas." [Online]. Available: http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=2844353_1477-3155-8-5-1&query=the&fields=all&favor=none&it=none&sub=none&uniq=0&sp=none&req=4&simCollection=1500870_gkl431f2&npos=81&prt=3.

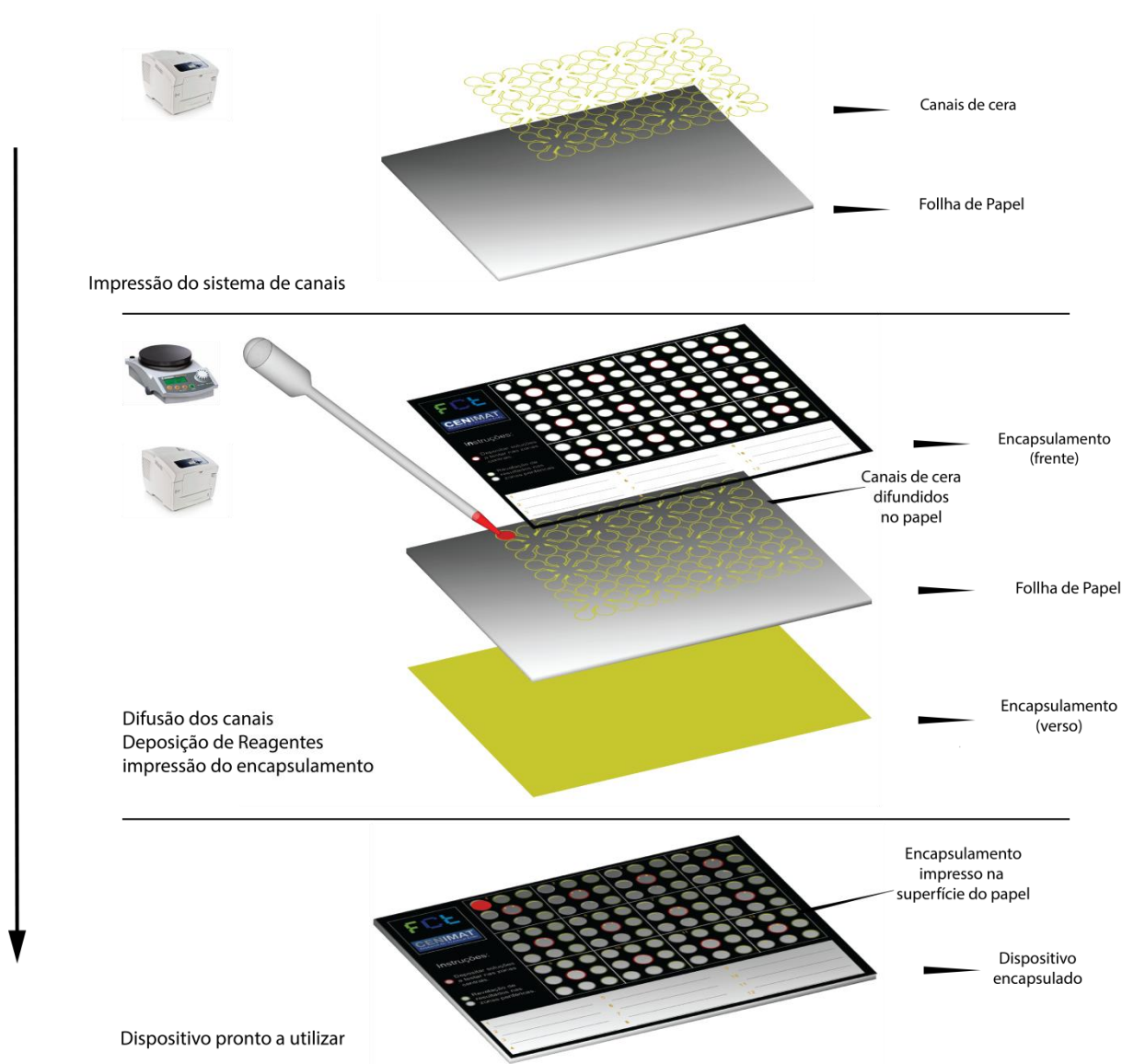
- [45] Ray F. Egerton, *Physical Principles of Electron Microscopy*. Springer Science+Business Media, Inc., 233 Spring St., New York, NY 10013, USA, 2005, p. 199.
- [46] "Information Beyond Resolution Carl Zeiss Microscopy Electron and Ion Beam Microscopes." .
- [47] J. Goldstein, D. Newbury, D. Joy, and C. Lyman, *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. 2003, p. 689.
- [48] "Esquema SEM." [Online]. Available: <http://www.purdue.edu/rem/rs/sem.htm>.
- [49] "ângulo de contacto." [Online]. Available: <http://www.ramehart.com/contactangle.htm>. [Accessed: 20-Aug-2012].
- [50] D. Y. Kwok and a. W. Neumann, *Contact angle measurement and contact angle interpretation*, vol. 81, no. 3. 1999, pp. 167–249.
- [51] R. Davis and L. Mauer, "Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy: a rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria," *Current research, technology and education topics ...*, no. 1, pp. 1582–1594, 2010.
- [52] S. Ir, F. T. Infrared, A. T. Reflectance, and A. Atr-diffusion, "Chapter 4 4.1 FTIR-ATR Diffusion Study," pp. 21–61.
- [53] T. Hatakeyama and F. X. Quinn, *Thermal Analysis Fundamentals and Applications to Polymer Science*, Second. John Wiley & Sons Ltd.
- [54] V. Mamleev, S. Bourbigot, and J. Yvon, "Kinetic analysis of the thermal decomposition of cellulose: The main step of mass loss," *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, vol. 80, no. 1, pp. 151–165, Aug. 2007.
- [55] P. Gabbott, *Principles and applications of thermal analysis*. 2008.
- [56] G. B. Microplates, "Microplate Dimensions Guide." .
- [57] B. Veigas, D. Machado, J. Perdigão, I. Portugal, I. Couto, M. Viveiros, and P. V Baptista, "Aunanoprobe for detection of SNPs associated with antibiotic resistance in Mycobacterium tuberculosis," *Nanotechnology*, vol. 21, no. 41, p. 415101, Oct. 2010.
- [58] B. Veigas, G. Doria, P. V Baptista, D. De Ciências, and F. De Ciências, "Nanodiagnostics for Tuberculosis," 2010.
- [59] C. Lee and D. Meisel, "Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols," vol. 60439, no. 50 mL, pp. 3391–3395, 1982.
- [60] P. V Baptista, M. Koziol-Montewka, J. Paluch-Oles, G. Doria, and R. Franco, "Gold-nanoparticle-probe-based assay for rapid and direct detection of Mycobacterium tuberculosis DNA in clinical samples," *Clinical chemistry*, vol. 52, no. 7, pp. 1433–4, Jul. 2006.
- [61] E. Carrilho and A. Martinez, "Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics," *Analytical chemistry*, 2009.
- [62] W. Dungchai, O. Chailapakul, and C. S. Henry, "Use of multiple colorimetric indicators for paper-based microfluidic devices," *Analytica chimica acta*, vol. 674, no. 2, pp. 227–33, Aug. 2010.
- [63] A. Martinez, S. Phillips, and G. Whitesides, "Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices," *Analytical*, 2009.
- [64] Mafalda Costa, "Desenvolvimento de microfluídica em papel para utilização em bissensores," Faculdade de Ciência e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa, 2012.
- [65] M. N. N. Kobayayashi, "HOT MELT SOLID INK COMPOSITION," U.S. Patent 60229102000.
- [66] T. Mannsville Chemical Products Spring, "Sodium Chlorate," 2006.
- [67] R. Buzio, P. Calvini, a. Ferroni, and U. Valbusa, "Surface analysis of paper documents damaged by foxing," *Applied Physics A: Materials Science & Processing*, vol. 79, no. 2, pp. 383–387, Jul. 2004.
- [68] T. Buffeteau, B. Desbat, and D. Eyquem, "Attenuated total reflection Fourier transform infrared microspectroscopy: Theory and application to polymer samples," *Vibrational spectroscopy*, vol. 1, pp. 29–36, 1996.
- [69] S. Tatulian, "Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy: a method of choice for studying membrane proteins and lipids," *Biochemistry*, pp. 11898–11907, 2003.

- [70] K. K. Pandey, "A Study of Chemical Structure of Soft and Hardwood and Wood Polymers by FTIR Spectroscopy," *Polymer*, vol. 71, no. May, pp. 1969–1975, 1998.
- [71] a Synytsya, "Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins," *Carbohydrate Polymers*, vol. 54, no. 1, pp. 97–106, Oct. 2003.
- [72] M. Halttunen, "DETERMINATION OF SB-LATEX DISTRIBUTION AT PAPER COATING SURFACES WITH FTIR / ATR SPECTROSCOPY."
- [73] A. Gorassini, P. Calvini, and A. Baldin, "Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) Analysis of Historic Paper Documents as a Preliminary Step for Chemometrical Analysis," vol. 1730, no. June, pp. 2–3, 2008.
- [74] N. Ferrer and M. C. Sistach, "FTIR Technique Used to Study Acidic Paper Manuscripts Dating from the Thirteenth to the Sixteenth Century from the Archive of the Crown of Aragón," vol. 26, pp. 21–25, 2007.
- [75] A. N. A. Emandi, C. I. Vasiliu, and P. Budrugaec, "QUANTITATIVE INVESTIGATION OF WOOD COMPOSITION BY INTEGRATED FT-IR AND THERMOGRAVIMETRIC METHODS," vol. 45, pp. 579–584, 2011.
- [76] "Whatman Chromatography Paper." [Online]. Available: <http://www.whatman.com/ChromatographyPaper.aspx>. [Accessed: 08-May-2012].
- [77] M. C. Silva, O. R. Lopes, J. L. Colodette, a. O. Porto, J. Rieumont, D. Chaussy, M. N. Belgacem, and G. G. Silva, "Characterization of three non-product materials from a bleached eucalyptus kraft pulp mill, in view of valorising them as a source of cellulose fibres," *Industrial Crops and Products*, vol. 27, no. 3, pp. 288–295, May 2008.
- [78] S. Soares, M. P. S. Ricardo, S. Jones, and F. Heatley, "High temperature thermal degradation of cellulose in air studied using FTIR and 1 H and 13 C solid-state NMR," vol. 37, 2001.
- [79] "Thermal Decomposition of Cellulose/Synthetic Polymer Blends Containing Grafted Products. V. Cellulose/Polystyrene Blends.pdf." .
- [80] E. C. da Silva Filho, S. a. a. Santana, J. C. P. Melo, F. J. V. E. Oliveira, and C. Airoidi, "X-ray diffraction and thermogravimetry data of cellulose, chlorodeoxycellulose and aminodeoxycellulose," *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 100, no. 1, pp. 315–321, Jul. 2009.
- [81] D. Reflectance and P. Samples, "Diffuse Reflectance – Theory and Applications."
- [82] J. Reeves, G. McCarty, and T. Mimmo, "The potential of diffuse reflectance spectroscopy for the determination of carbon inventories in soils.," *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, vol. 116 Suppl , pp. S277–84, Jan. 2002.
- [83] C.-M. Cheng, A. W. Martinez, J. Gong, C. R. Mace, S. T. Phillips, E. Carrilho, K. a Mirica, and G. M. Whitesides, "Paper-based ELISA.," *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, vol. 49, no. 28, pp. 4771–4, Jun. 2010.
- [84] B. Veigas, G. Doria, and P. V. Baptista, "Nanodiagnosics for Tuberculosis, Understanding Tuberculosis-Global Experiences and Innovative Approaches to the Diagnosis," D. P.-J. Cardona, Ed. InTech, 2012, pp. 257–276.

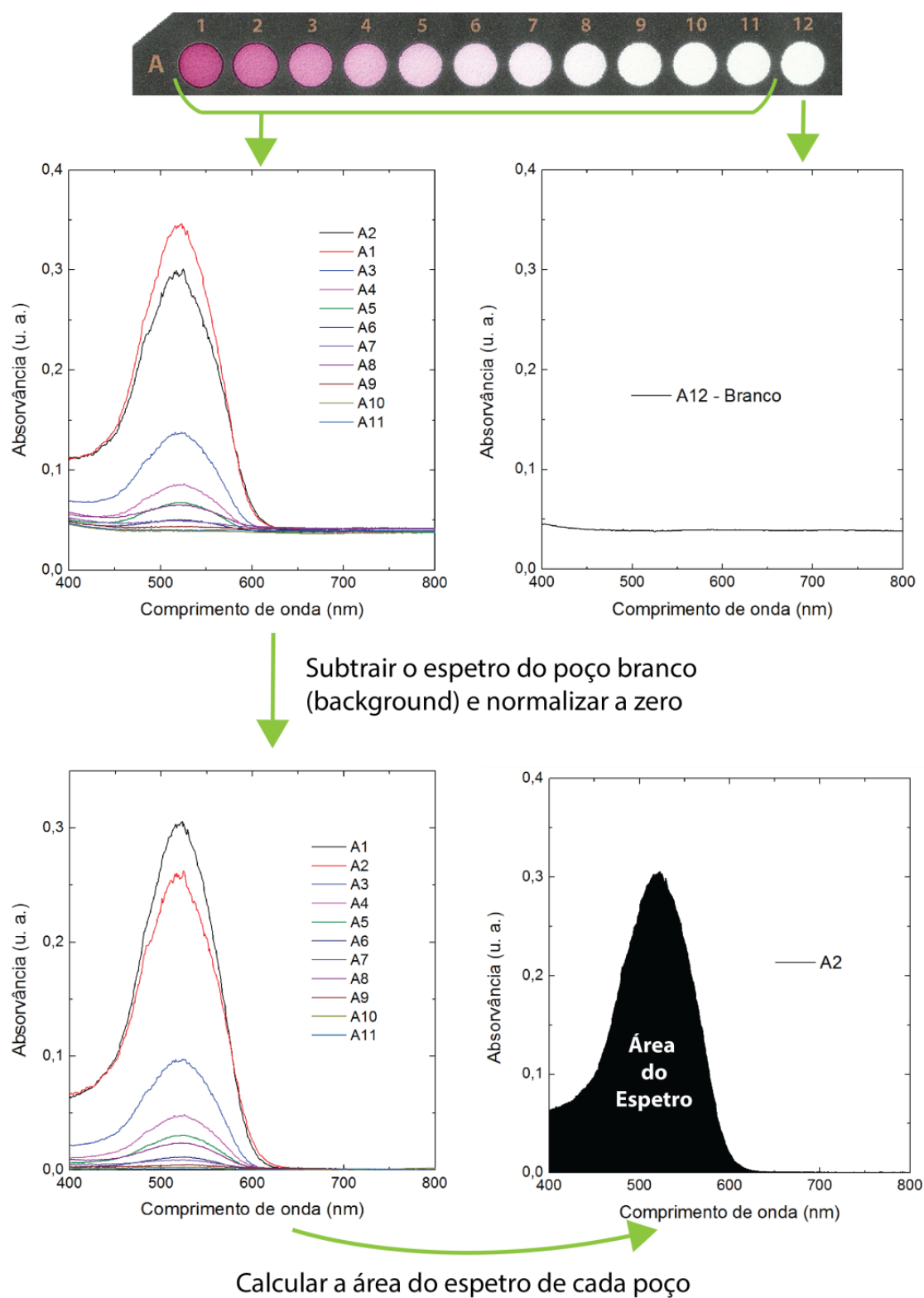
ANEXOS

Anexo 1 - Definições da impressora

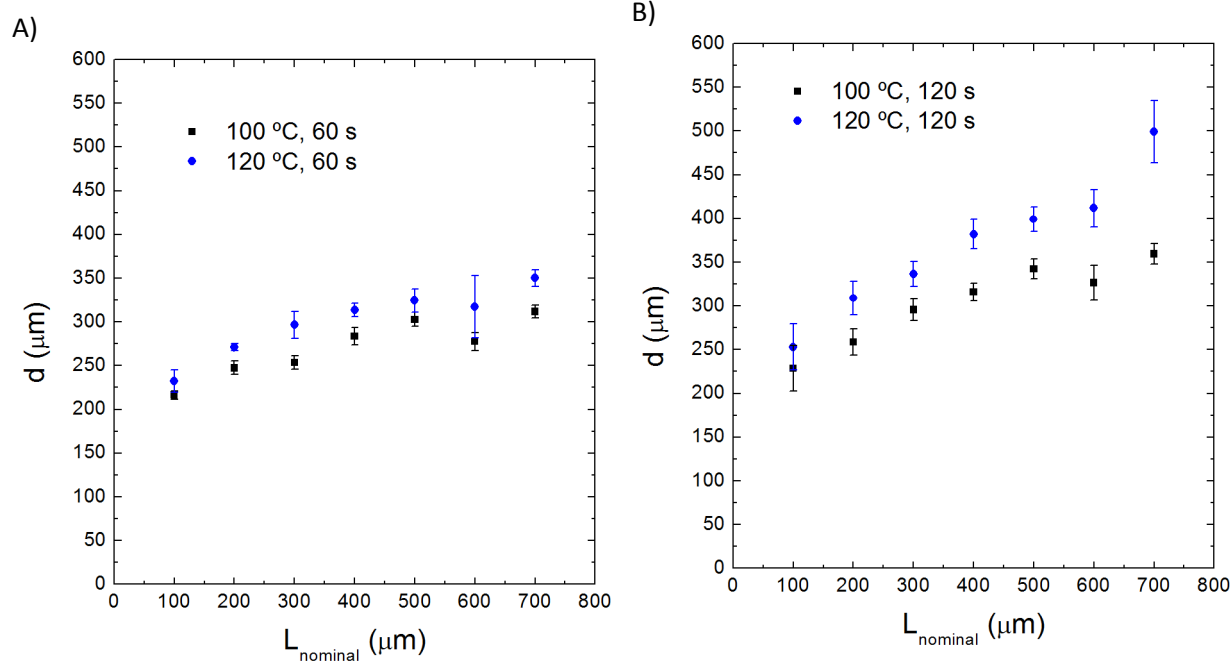


Anexo 2 - Procedimento de fabrico de um formato alternativo de microplaca

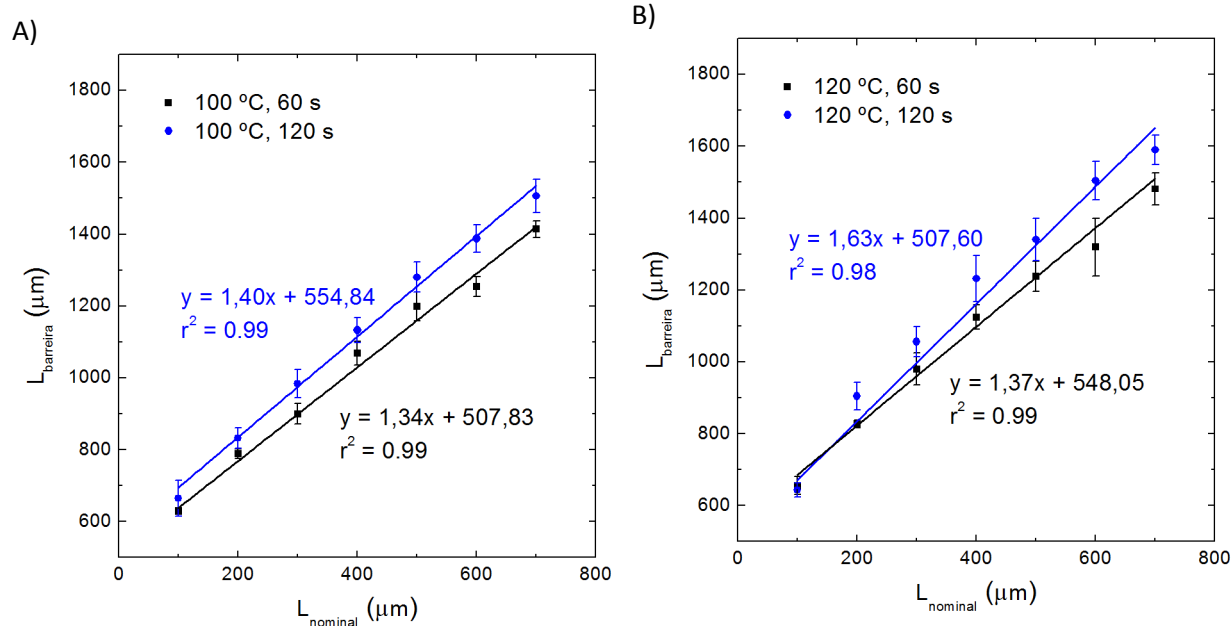
Anexo 3 - Fluxograma do tratamento de resultados de absorvância



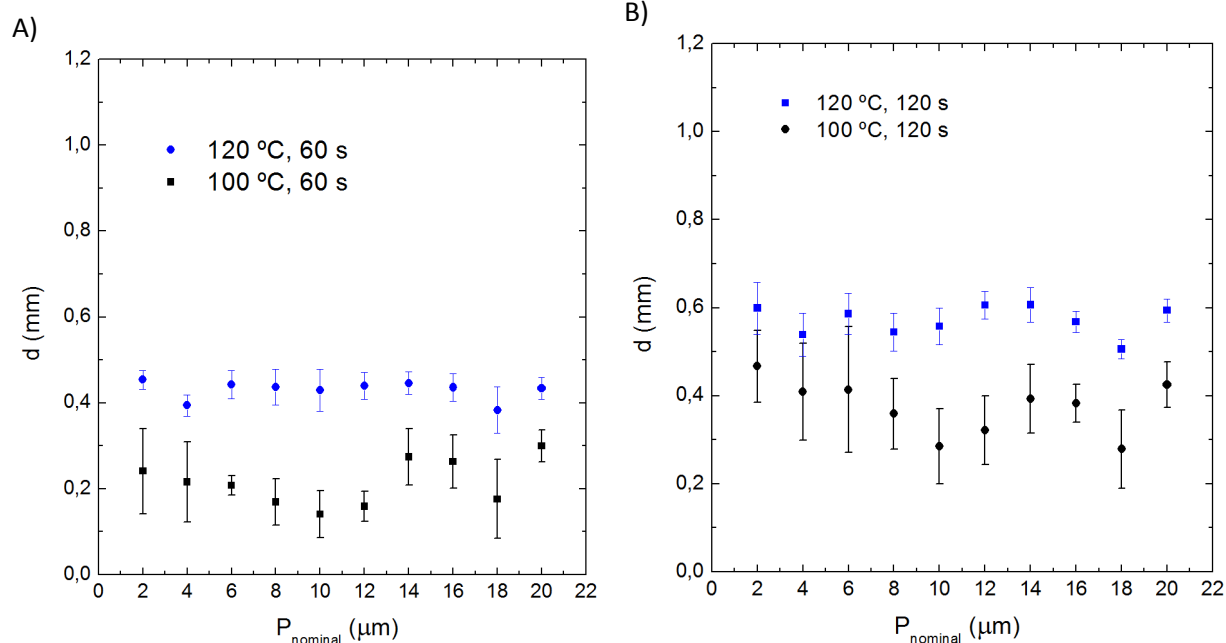
Anexo 4 - Difusão em função da dimensão nominal da linha



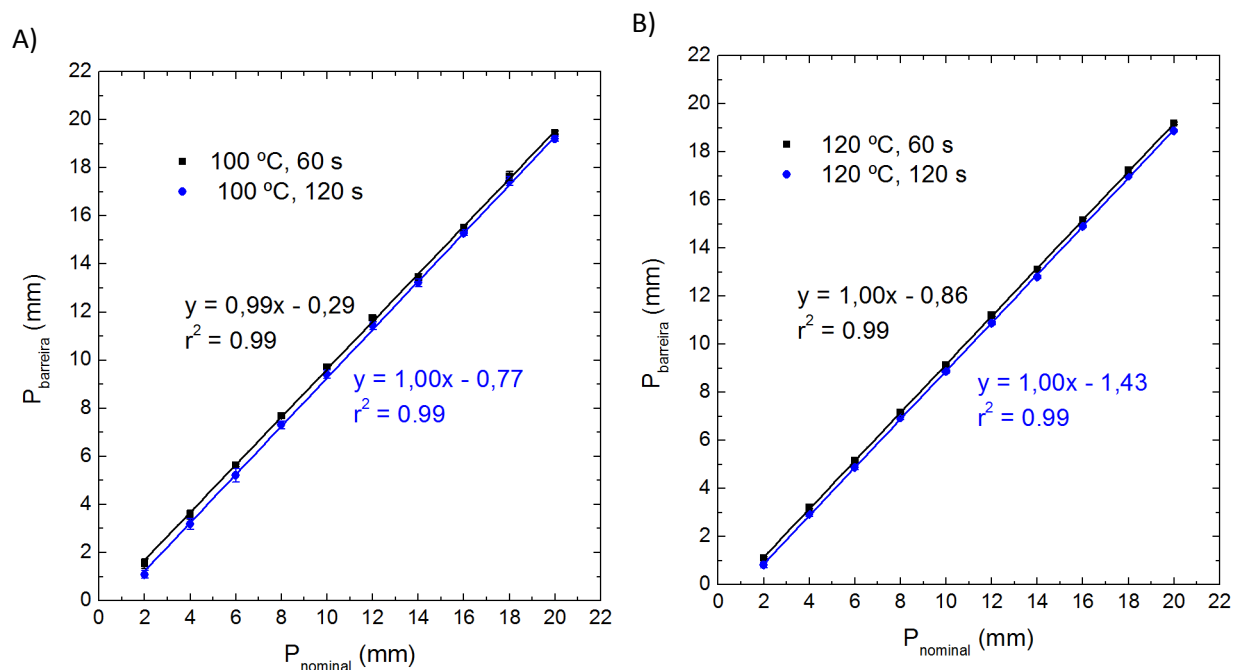
Anexo 5 - Representação gráfica de L_{barreira} em função de L_{nominal} para : A) séries 3 e 4; B) séries 5 e 6.

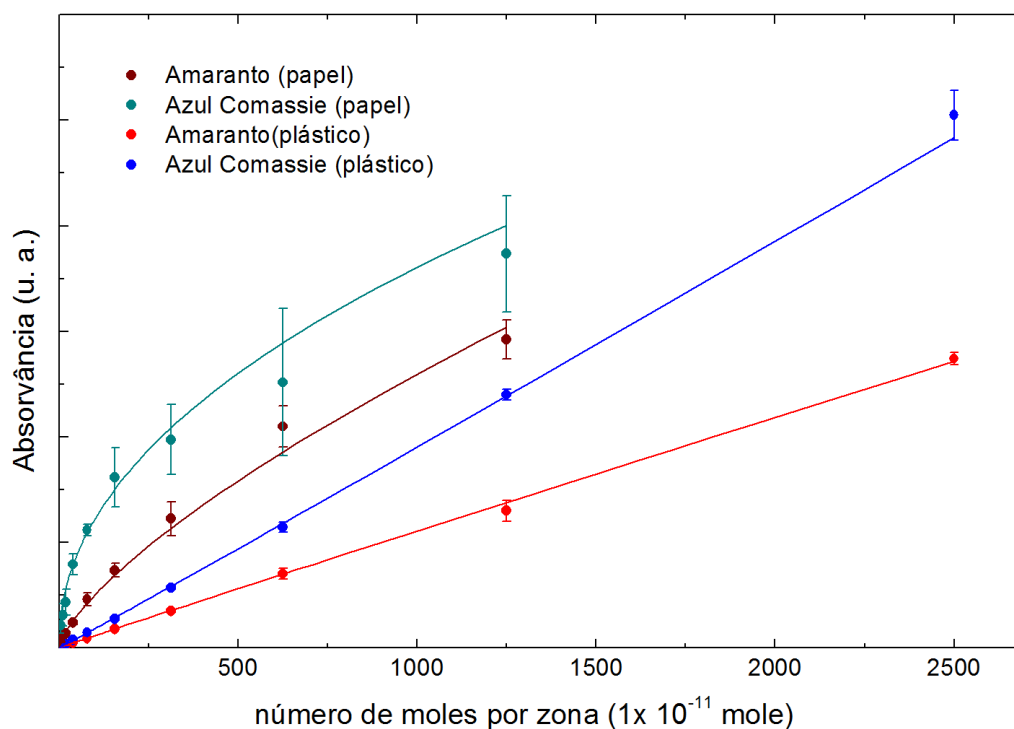
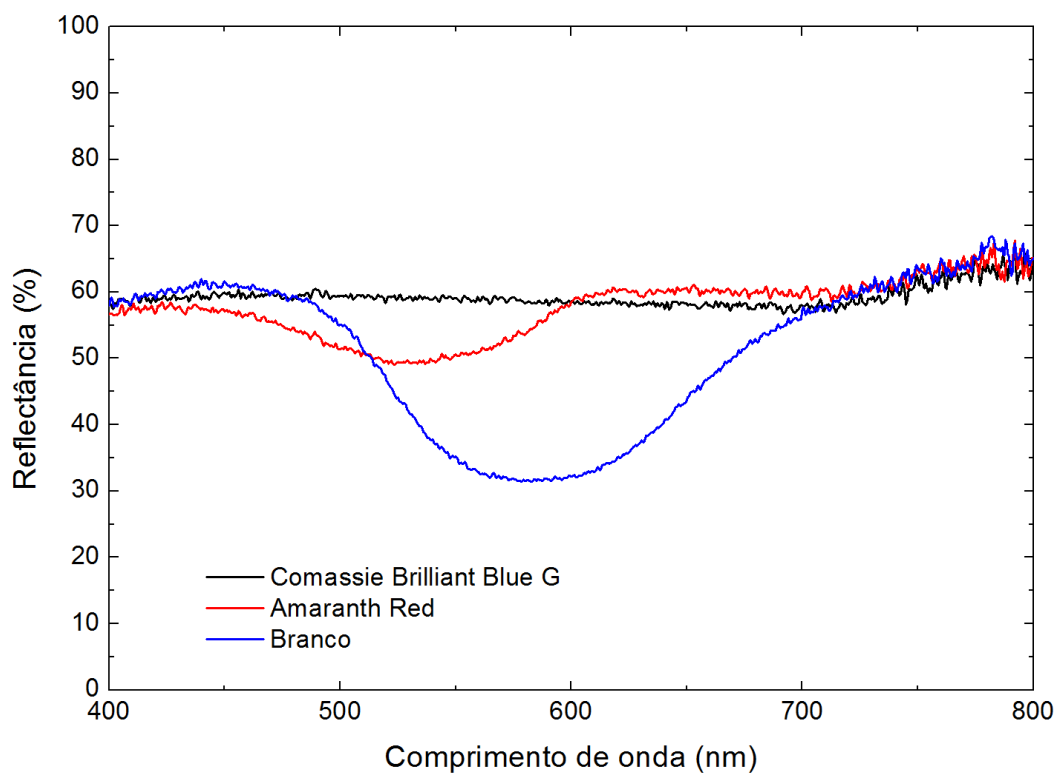


Anexo 6 - Difusão em função do diâmetro nominal dos poços.

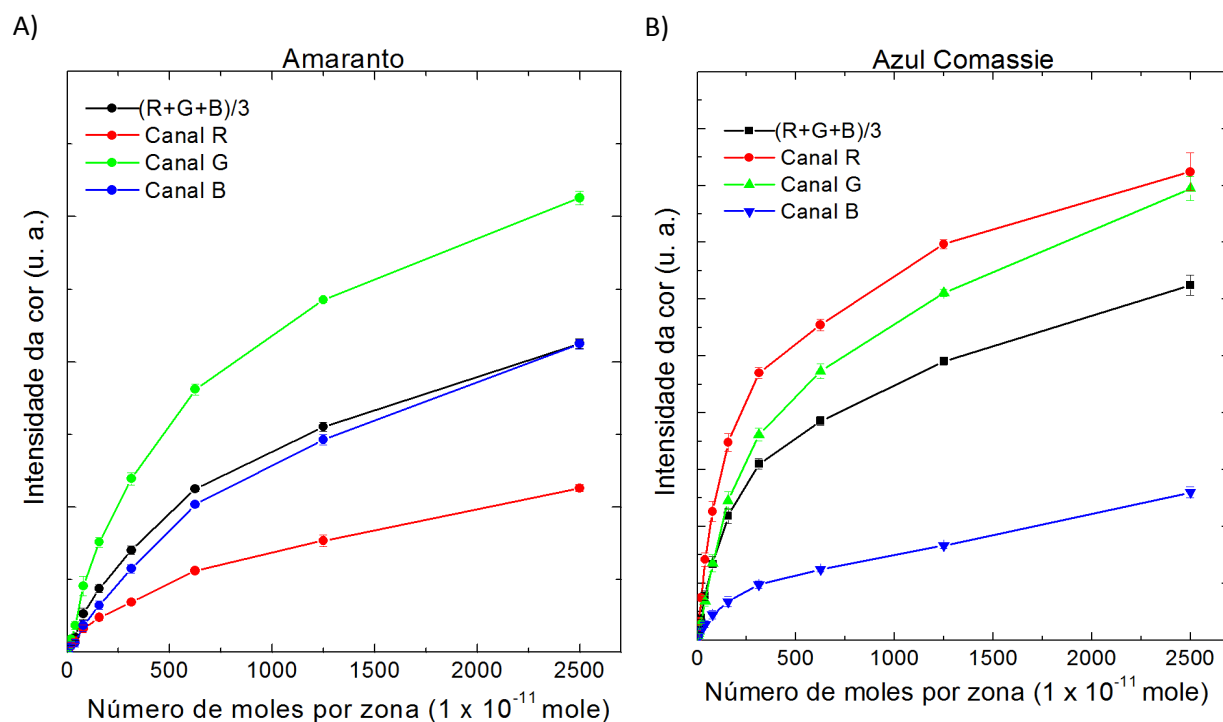


Anexo 7 - Representação gráfica de P_{barreira} em função de P_{nominal} para : A) séries 3 e 4; B) séries 5 e 6.



Anexo 8 - Representação gráfica da absorvância em função da quantidade de corante em microplaca de papel e plástico.**Anexo 9 - Espectros de refletância em papel de filtro de café.**

Anexo 10 - Análise RGB das diluições dos corantes



Anexo 11 - Teste Tukey para comparação de médias para os ensaios ELISA

	Mean Diff.	q	Significance P < 0.001		99.9% CI of diff
Positivo vs Negativo	11,55	7,922	Yes	***	1.465 to 21.64
Positivo vs Controle	20,43	14,01	Yes	***	10.34 to 30.51
Negativo vs Controle	8,875	6,086	No	**	-1.211 to 18.96

Anexo 12 - Teste Tukey para comparação de médias para os ensaios da plataforma *Gold on paper*

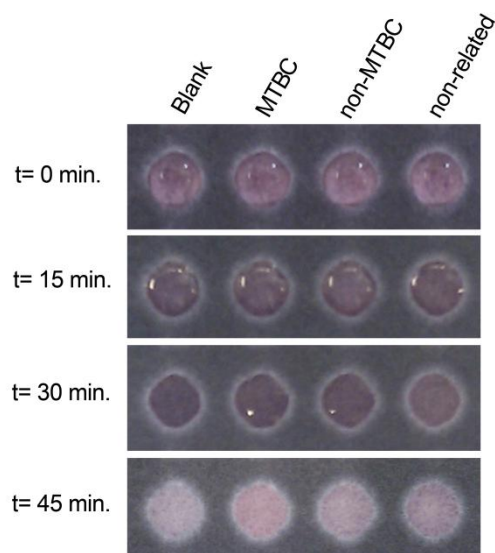
	Mean Diff.	q	Significance P < 0.001		99.9% CI of diff
MTBC sample 10ng/uL vs MTBC sample 20ng/uL	-0.01735	2.669	No	ns	-0.06732 to 0.03262
MTBC sample 10ng/uL vs non-MTBC sample 10ng/uL	0.07018	11.54	Yes	***	0.02343 to 0.1169
MTBC sample 10ng/uL vs non-MTBC sample 20ng/uL	0.069	11.87	Yes	***	0.02430 to 0.1137
MTBC sample 20ng/uL vs non-MTBC sample 10ng/uL	0.08753	14.39	Yes	***	0.04078 to 0.1343
MTBC sample 20ng/uL vs non-MTBC sample 20ng/uL	0.08635	14.85	Yes	***	0.04165 to 0.1310
non-MTBC sample 10ng/uL vs non-MTBC sample 20ng/uL	-0.001181	0.2211	No	ns	-0.04224 to 0.03987

Anexo 13 - Teste Tukey para comparação de médias para os ensaios revelados no leitor de microplacas

	Mean Diff.	q	Significance P < 0.001		99.9% CI of diff
MTBC sample 10ng/uL vs MTBC sample 20ng/uL	-0.09902	15.9	Yes	***	-0.1549 to -0.04312
MTBC sample 10ng/uL vs non-MTBC sample 10ng/uL	0.07231	11.61	Yes	***	0.01641 to 0.1282
MTBC sample 10ng/uL vs non-MTBC sample 20ng/uL	0.08604	13.82	Yes	***	0.03013 to 0.1419
MTBC sample 20ng/uL vs non-MTBC sample 10ng/uL	0.1713	27.52	Yes	***	0.1154 to 0.2272
MTBC sample 20ng/uL vs non-MTBC sample 20ng/uL	0.1851	29.72	Yes	***	0.1292 to 0.2410
non-MTBC sample 10ng/uL vs non-MTBC sample 20ng/uL	0.01372	2.204	No	ns	-0.04218 to 0.06962

Anexo 14 - Variação colorimétrica de um ensaio da plataforma Gold on Paper.

Colorimetric detection (Probe MTBC)



Lab on a Chip

View Online / Journal Homepage
Dynamic Article Links

Cite this: DOI: 10.1039/c2lc40739f

www.rsc.org/loc

PAPER

Gold on paper—paper platform for Au-nanoprobe TB detection†

Bruno Veigas,^{ab} Jorge M. Jacob,^b Mafalda N. Costa,^b David S. Santos,^b Miguel Viveiros,^c João Inácio,^d Rodrigo Martins,^b Pedro Barquinha,^b Elvira Fortunato^{*b} and Pedro Viana Baptista^{*a}

Received 29th June 2012, Accepted 29th August 2012

DOI: 10.1039/c2lc40739f

Tuberculosis (TB) remains one of the most serious infectious diseases in the world and the rate of new cases continues to increase. The development of cheap and simple methodologies capable of identifying TB causing agents belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* Complex (MTBC), at point-of-need, in particular in resource-poor countries where the main TB epidemics are observed, is of paramount relevance for the timely and effective diagnosis and management of patients. TB molecular diagnostics, aimed at reducing the time of laboratory diagnostics from weeks to days, still require specialised technical personnel and labour intensive methods. Recent nanotechnology-based systems have been proposed to circumvent these limitations. Here, we report on a paper-based platform capable of integrating a previously developed Au-nanoprobe based MTBC detection assay—we call it “Gold on Paper”. The Au-nanoprobe assay is processed and developed on a wax-printed microplate paper platform, allowing unequivocal identification of MTBC members and can be performed without specialised laboratory equipment. Upon integration of this Au-nanoprobe colorimetric assay onto the 384-microplate, differential colour scrutiny may be captured and analysed with a generic “smartphone” device. This strategy uses the mobile device to digitalise the intensity of the colour associated with each colorimetric assay, perform a Red Green Blue (RGB) analysis and transfer relevant information to an off-site lab, thus allowing for efficient diagnostics. Integration of the GPS location metadata of every test image may add a new dimension of information, allowing for real-time epidemiologic data on MTBC identification.

1 Introduction

Tuberculosis (TB) is mainly caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, Mtb), a member of the *M. tuberculosis* Complex (MTBC) and, according to the World Health Organisation, it remains one of the most serious infectious diseases in the world, responsible for 1.1 million deaths and 8.8 million new cases in 2010 alone.¹ Recent advances in molecular diagnostics of TB have improved the detection capability of the pathogen but many of these methods require specialised technical personnel and expensive laboratory equipment.^{2–6} Several new technologies are under development, which will enable the presumptive detection of MTBC in just one to two days. Diagnostics at point-of-need is crucial to TB control as rapid identification and pathogen

characterisation may allow patients to get immediate treatment that is vital in addressing this pandemic.

Recently, there have been reports on paper-based analytical systems suitable for application in diagnostics at point-of-need.^{7–10} An interesting approach combines the use of inexpensive paper-based platforms and digital image analysis to screen for relevant analytes.¹¹ This concept makes use of quantitative colorimetric correlations using mobile cameras to digitalise results allowing the measurement of colour intensity, *i.e.* to conduct quantitative microscale bioanalysis assays without expensive laboratory equipment. Recently, Carrilho and colleagues extended this concept *via* multizone standard 384-well paper microplates to be used as an alternative to conventional multiwell plates fabricated in moulded polymers.^{12,13} Paper-based plates are functionally related to plastic well plates, and offer interesting capabilities, such as (i) multiplex assays; (ii) the ability to store, mix, and combine reagents; (iii) multiple sample assaying with a single device; and (iv) the ability to capture the result in a digital image format with a generic mobile device. The fabrication process involves two core operations: printing patterns of wax on the surface of the paper and melting the wax into the paper to form complete hydrophobic barriers. Only just have paper platforms been used for gold nanoparticle based surface enhanced Raman scattering (SERS) bio-detection assays.^{14,15}

^aCIGMH, Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Campus de Caparica, 2829-516 Caparica, Portugal. E-mail: pmbv@fct.unl.pt; Fax: +351 21 294 8530

^bCENIMAT/13N, Departamento de Ciência dos Materiais, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Campus de Caparica, 2829-516 Caparica, Portugal. E-mail: emf@fct.unl.pt

^cGrupo de Micobactérias, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Portugal

^dInstituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, IP, Lisboa, Portugal

† Electronic Supplementary Information (ESI) available: See DOI: 10.1039/c2lc40739f

View Online

Despite the wide range of nanoscale systems for biomolecular assays,^{16–18} those based on nanoparticles, and gold nanoparticles (AuNPs) in particular, have been the most widely used for TB diagnostics.^{19–22} These AuNPs exhibit amazing properties, such as intense colours and ease of functionalisation with relevant biomolecular moieties for bio-recognition, e.g. antibodies and ssDNA oligonucleotides. Solutions containing AuNPs usually exhibit an intense red colour derived from the surface plasmon resonance (SPR) band centred around 520 nm; AuNP aggregation results in a red-shift of the SPR and the solution changes colour to blue.²³ The first use of such properties for the detection of *M. tuberculosis* was introduced by our group in 2006 in an assay that relied on the colorimetric changes of a solution containing AuNPs functionalised with thiol-modified ssDNA oligonucleotides (Au-nanoprobe) complementary to a region of the RNA polymerase beta subunit *locus* capable of identifying MTBC members.²⁰ The method relies on the hybridisation between the Au-nanoprobe and the target sequence from the pathogen. In this non-cross-linking assay, the aggregation of the AuNPs is induced by salt addition and the presence of a complementary target prevents Au-nanoprobe aggregation and the solution remains red; the absence of a complementary target does not prevent Au-nanoprobe aggregation, which results in a visible colour change from red to blue. This low-complexity

assay was subsequently used for the detection of MTBC specimens and mutations associated with antibiotic resistance in clinical specimens with remarkable sensitivity in just a few hours.^{20,22,24}

Here, we report on the integration of this colorimetric Au-nanoprobe assay with a paper-platform that allows colour development and a simple data analysis tool capable of the specific detection of MTBC members. The Au-nanoprobe hybridisation to the specific DNA target sequence yields an intensive red-colour that can be easily differentiated from a non-complementary sequence, which yields a blue coloured solution. The wax printed 384 well plate is impregnated with a pre-determined concentration of salt (MgCl_2) capable of inducing Au-nanoprobe aggregation, thus yielding a colorimetric discrimination indicating the presence of the specific DNA target. Because of the white background of the paper, the colour contrast is greatly improved without the need for expensive constituents. We further demonstrate the integration of this paper-platform with a smartphone and a simple data analysis tool that together are capable of quantifying the colorimetric changes on the paper plate system and transmitting the metadata to a centralised off-site laboratory (Fig. 1). This principle can be extended to any other standard mobile imaging device with GPS capability. This integrated *Gold on Paper* platform was then used

Downloaded by Universidade Nova de Lisboa on 25 September 2012
Published on 31 August 2012 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/C2LC00739F

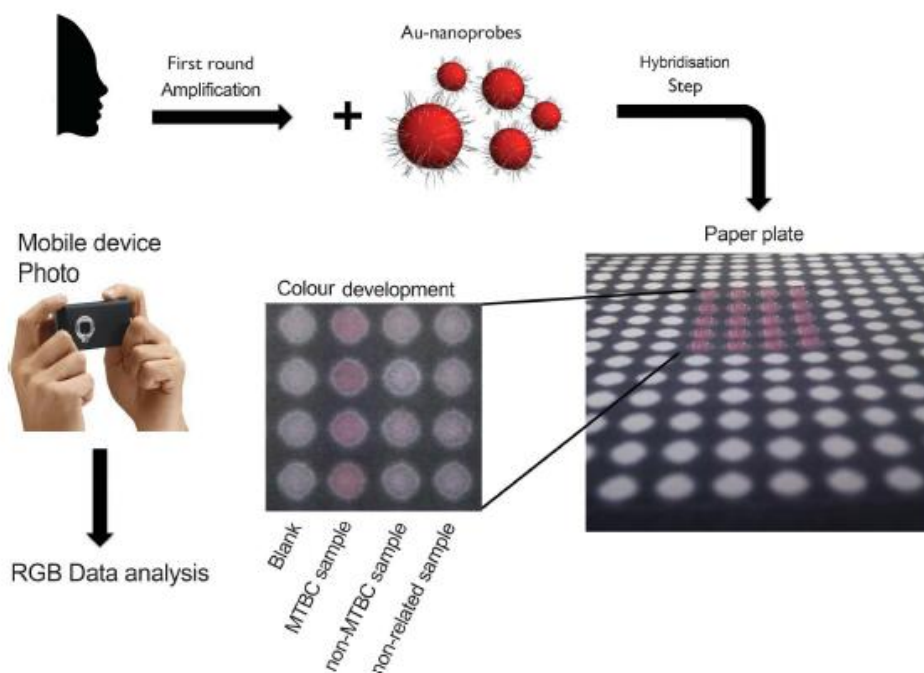


Fig. 1 Au-Nanoprobe strategy for the detection of MTBC members. Schematic representation of the detection with gold nanoprobes. The colorimetric assay consists of visual comparisons of test solutions after salt induced Au-nanoprobe aggregation on a $[\text{MgCl}_2]$ impregnated paper plate: MTBC Au-nanoprobe alone—Blank; MTBC Au-nanoprobe in the presence of MTBC sample—*M. tuberculosis*; MTBC Au-nanoprobe in the presence of a non-MTBC sample; and MTBC Au-nanoprobe in the presence of a non-complementary sample—non-related. After colour development a photo of the paper plate is captured and RGB image analysis is performed.

View Online

for the identification of DNA from MTBC. This novel integrated platform—*Gold on Paper*—holds great promise for a fast and cheap molecular diagnostics strategy for TB diagnostics at point-of-need. For the first time, a nanodiagnostics approach for the molecular characterisation of TB is combined with a simple paper based platform for use as a tool for the unequivocal identification of *Mycobacterium tuberculosis* in an easy to use lab-on-paper strategy. The integration of the *Gold on Paper* platform with the data analysis strategy on a mobile device may be proven as an effective simple approach to TB molecular screening in less than 2 h.

2 Materials and methods

2.1 Gold on Paper platform preparation

Starting from sheets of a cellulose substrate Whatman No. 1 Chromatography paper (Whatman International Ltd., Floram Park, NJ, USA), A5 standard format (210 × 148 mm) sheets were cut. This paper size fits directly into the manual feed tray of a commercial solid ink printer (Xerox ColorQube 8570, Xerox Corporation, Norwalk, CT, USA) designed to print a wax based ink, originating hydrophobic barriers.¹³ Paper microplates were designed with a standard 384 plate format in Microsoft Office Visio® (Microsoft Corporation, US). All the measurements were taken from the "Microplate Dimensions Guide, Compendium of Greiner Bio-one microplates" (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany). The printed pattern of a 384 microplate was placed on a hot plate (Heidolph MR Hei-Tec, Schwabach, Germany) at 140 °C for 2 min, allowing the wax to melt and spread vertically through the whole thickness of the paper, creating the desired hydrophobic pattern—see the ESI† for production and characterisation.†

Each well was impregnated with 1 µL of a 0.12 M MgCl₂ solution (revelation agent) and allowed to dry at 25 °C for 10 min. The final microplates were stored at 25 °C, and wrapped in aluminium foil until use.

2.2 Scanning electron microscopy (SEM) analysis

Samples were mounted on aluminium stubs with carbon tape and coated with an 8 nm thick palladium-gold film in a Quorum Q150T ES sputtering system. The sample surface was observed in a Carl Zeiss AURIGA Crossbeam SEM-FIB workstation, using an accelerating voltage of 2 KeV with an aperture size of 30 microns.

2.3 Sample DNA preparation

A specific Polymerase Chain Reaction (PCR)-amplified 395 bp fragment of the *M. tuberculosis* RNA polymerase β-subunit (*rpoB*-GenBank accession no. L27989) gene suitable for detection of MTBC members was used as target for the Au-nanoprobe detection assay. PCR amplification was performed in a final volume of 50 µL containing 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.2 mM MgCl₂, 200 mM of each dNTP, and 1 U of *Taq* DNA polymerase (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Europe, GmbH), 10 pmol of each primer (P1 5'-GAG AAT TCG GTC GGC GAG CTG ATC C-3'; P2 5'-CGA AGC TTG ACC CGC GCG TAC ACC-3')^{3,25} involving 35 cycles of 45 s denaturation at 94 °C, 45 s annealing at 58 °C followed by 45 s

extension at 72 °C. Amplification was observed by 1% Agarose gel electrophoresis and was further confirmed by direct sequencing using Big Dye v3.1 Terminator technology (STABVIDA, Almada, Portugal). DNA samples isolated from *M. tuberculosis* and non-MTBC *Mycobacteria* cultures were used as positive MTBC (complementary) and non-MTBC (non-complementary) samples, respectively. DNA from an unrelated organism was used as non-related. The non-MTBC sample is derived from a clinical isolate from *Mycobacterium kansasii*, whose sequence differs from that of the *M. tuberculosis rpoB* target region by a single nucleotide (see the ESI†).

2.4 Au-nanoprobe synthesis and characterisation

Gold nanoparticles, with an average diameter of ~14 nm, were synthesised by the citrate reduction method described by Lee and Meisel.²⁶ Briefly, 250 mL of 1 mM HAuCl₄ was heated while stirring, 25 mL of 28.8 mM sodium citrate was added, and the solution was refluxed for 15 min. Afterwards, the solution was left at room temperature to cool down. The gold nanoparticles were prepared by incubating the thiol-modified oligonucleotides with the AuNPs for 16 h. The solution was washed with 10 mM phosphate buffer (pH 8), and increasing salt concentration, in order to reduce non-specific binding between the thiol-modified oligonucleotides and the AuNPs. The solution was centrifuged, the resulting pellet resuspended in 10 mM phosphate buffer (pH 8), 0.1 M NaCl, and stored in the dark at 4 °C until further use.²⁷

A comparative analysis of *rpoB* gene sequences from mycobacteria was performed through sequence alignment using Geneious v.4.7.6 software. Probe specificity was tested *in silico* using BLAST tools from GenBank. The MTBC probe 5'-thiol-GAT CGC CTC CAC GTC C-3' (STABVIDA, Portugal) was then used to functionalise the AuNPs as previously described.^{20,22} For target discrimination assessment in assay calibration, non-modified synthetic oligonucleotides were used, MTBC sequence 5'-GGA GAT TGG TTT TGA CGT TTA TGT GGA CGT GGA GGC GAT C-3'; and non-MTBC 5'-GGA GAT TGG TTT TGA CGT TTA TGT GGA TCG CCT CCA CGT C) positive (complementary) and negative (non-complementary), respectively. These calibration data were used to assess the probe specificity in the presence of the DNA sample.

2.5 Au-nanoprobe colorimetric assay

The 395 base pair (bp) PCR products were ethanol precipitated, resuspended in deionised water and used for the Au-nanoprobe assay (see also the ESI†). Each colorimetric assay was performed in a total volume of 30 µL, with Au-nanoprobes at a final concentration of 2.5 nM in 10 mM phosphate buffer (pH 8), 0.1 M NaCl and target DNA at a final concentration of 30 µg mL⁻¹, as previously described.^{20,22} The assay involves the visual comparison of a "Blank" (without DNA), 10 mM phosphate buffer (pH 8), 0.1 M NaCl; "Probe", 10 mM phosphate buffer (pH 8); and the samples. After 10 min at 95 °C for target DNA denaturation, the mixtures were allowed to stand for 30 min at room temperature and MgCl₂ was added-[MgCl₂] = 0.02 M for the MTBC probe. After 30 min at room temperature, for colour development, the mixtures and the blank were assayed by UV/visible spectroscopy in a microplate reader (Tecan Infinite M200).

View Online

For assaying with the *Gold on Paper* platform, a total reaction mixture of 5 μL was used with 2.5 nM Au-nanoparticles in 10 mM phosphate buffer (pH 8), 0.1 M NaCl and target DNA at a final concentration of 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$. After 10 min of denaturation at 95 $^{\circ}\text{C}$, the mixtures were allowed to stand for 10 min at room temperature and spotted onto the well on the paper plate. After 45 min at room temperature for colour development, the paper plate was photographed with a mobile device and RGB analysis was performed.

2.6 Data acquisition and analysis

The colour pattern on the *Gold on Paper* was captured with an HTC Desire android smartphone with a 5 megapixel camera (2592 \times 1944 pixels) with autofocus. Photos were taken with artificial white light without flash. Blank test spots with 10 mM phosphate buffer (pH 8), were used to normalise the data for light conditions. The digitalised data were then analysed without further manipulation with a free RGB analysis application (ColorPikr, WiseClue) and transmitted via a 3G network to a personal computer for image processing with ImageJTM. Each assay was repeated at least three times and on four different paper micro well plates.

A one-way ANOVA analysis, with Tukey's multiple comparison test, using GraphPad (San Diego, CA) was used to validate the results. The one-way analysis of variance was used to test for differences between two groups of data (Blank, MTBC sample, non-MTBC sample and non-related). Additional statistical analysis of the differences was carried out using Tukey's multiple comparison procedures.

3 Results and discussion

The *Gold on Paper* diagnostics strategy is depicted in Fig. 1. First, the Au-nanoparticles are incubated with the sample DNA for molecular recognition to take place. Then, the reaction mixture is spotted onto the paper microplate well for colour revelation. The colour change on the spots is then recorded by means of a camera on the generic mobile device and subsequently analysed via RGB.

To develop the *Gold on Paper* platform, we first optimised the Au-nanoparticle detection scheme for specific identification of DNA from *M. tuberculosis* (MTBC member). A specific Au-nanoparticle, targeting the *rpoB* locus shared by all MTBC members, was synthesised and optimised for use in the non-cross-linking detection method previously reported by our group.^{20,22,28}

A minimum of three individual parallel hybridisation experiments targeting the 395 bp amplicons derived from the *rpoB* gene were performed. The Au-nanoparticle solutions exhibit a strong red colour derived from the localised SPR of the AuNPs. Upon salt induced aggregation, the presence of the complementary target sequence protects the Au-nanoparticles against aggregation and the solution remains red; the absence of a complementary DNA target sequence to that of the Au-nanoparticle results in extensive aggregation and the solution turns blue due to the red-shift of the SPR band. Based on the UV/visible spectra obtained after salt addition, the ratio between the absorbance at 526 nm (contribution of the non-aggregated fraction of Au-nanoparticles) and absorbance at 600 nm (contribution from the aggregated

fraction of Au-nanoparticles) was calculated (Fig. 2A). A ratio of 1 may be considered as the point of equilibrium between non-aggregated and aggregated nanoparticles, hence the threshold to respectively discriminate between positive and negative samples. This way, it was possible to identify samples containing the target sequence.

Following calibration, the minimum amount of salt (MgCl_2) required for the aggregation of the Au-nanoparticles used in the calibration assay was impregnated in each well of the paper plate platform. The wax used for production of the paper microplate template retains the Au-nanoparticle solution and, because each well was impregnated with a probe specific concentration of salt, allows aggregation to occur. Paper-based microplates are well suited for work with small volumes of sample: 5 μL of solution is sufficient to uniformly fill a well in the 384 microplate standard format, while a plastic plate requires a minimum of 15 μL to fill the bottom of the well. This approach gives accurate results when detecting MTBC members, uses small volumes of sample (5 μL), allowing for a reduction of 6 times the total amount of probe and sample. After sample hybridisation with Au-nanoparticles, the 5 μL reaction volume was added to the paper microplate platform for colour development. After 45 min for solvent evaporation and colour development, a plate image was captured with a smartphone and the ratio between the red RGB channel and the blue RGB channel calculated—Fig. 2B and 2C (see also the ESI†).

The colorimetric data was then recorded with a smartphone and analysed directly on the device without further manipulation or was analysed after sending the information via 3G to a laptop for imaging processing (Fig. 2). The same samples were also evaluated in the traditional microplate reader setup. For all methodologies, the Au-nanoparticle system was capable of specific identification of *M. tuberculosis* DNA ($p < 0.0001$) with little variability between the methods and no loss of sensitivity and specificity when performing the colour analysis directly on the mobile device (see the ESI†).

The Au-nanoparticle assay is capable of discriminating the presence of the MTBC sample DNA down to a concentration of 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (i.e. 41 and 246 pmol of target for *Gold on Paper* and a microplate reader, respectively). The *Gold on Paper* platform shows a response to increasing sample DNA concentration similar to that of the microplate reader. However, the difference between positive and negative is less intense, although clearly statistically significant (see the ESI†).

Paper is a good medium for colour based spot tests as it provides a strong contrast and, due to the high surface-to-volume ratio, facilitates the accelerated evaporation of solutions and results in concentrated analytes. As can be seen in Fig. 2, the microplate signal is more intense than that of the *Gold on Paper* platform. This can be easily explained since a smaller amount of Au-nanoparticles is being used. In fact, the 5 μL reaction volume (versus 30 μL on the microplate reader) allows for complete and uniform coverage of the entire test zone with sharp colour change, enabling direct visual detection. This slight decrease in signal is greatly compensated by the simplicity of the detection without loss of sensitivity, and does not require a microplate reader or UV/vis spectrophotometer.

Smartphone devices eliminate the need to transmit data to achieve the result, allowing a fast and reliable analysis. Effective

View Online

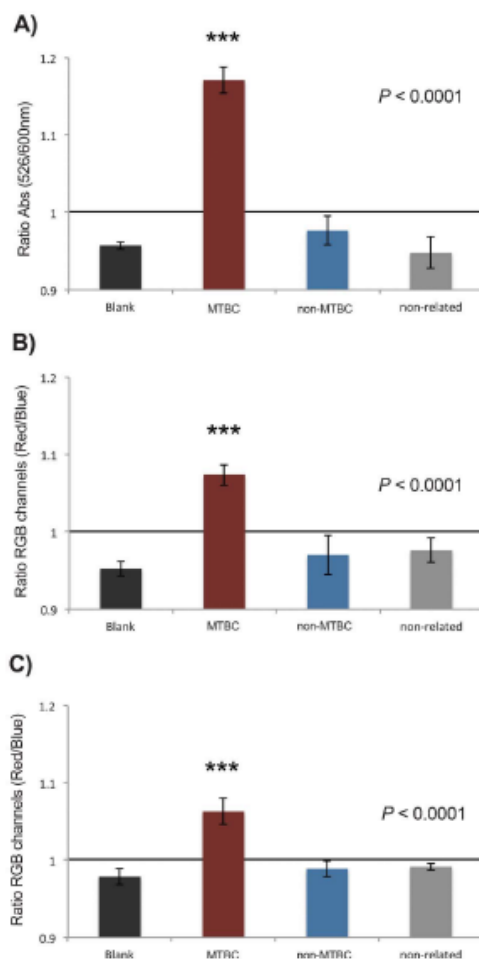


Fig. 2 Au-nanoprobe assay for MTBC detection: (A) MTBC standard assay performed in a microplate reader. Nanoprobe aggregation as measured by the ratio of aggregation (ratio of SPR intensity at 526 and 600 nm) for the assay mixtures—2.5 nM Au-nanoprobe, 10 mM phosphate buffer (pH 8), 0.1 M NaCl, and specific PCR amplified DNA at a final concentration of $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ in a final volume of $30 \mu\text{L}$. Sample detection, after 30 min incubation with $[\text{MgCl}_2] = 0.02 \text{ M}$; (B) MTBC assay performed in the paper microplate. Nanoprobe aggregation as measured by image RGB analysis. Ratio of aggregation calculated in ImageJTM on a PC (ratio of average intensity of the red and blue channels) for the assay mixtures. (C) MTBC assay performed in the paper microplate, nanoprobe aggregation as measured by image RGB analysis. Ratio of aggregation calculated in the smartphone (ratio of average intensity of the red and blue channels) for the assay mixtures. Paper microplate assay performed with—2.5 nM Au-nanoprobe, 10 mM phosphate buffer (pH 8), 0.1 M NaCl, and sample DNA at a final concentration of $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ in a final volume of $5 \mu\text{L}$ per test. Image captured after 45 min. The bars represent the average of three independent measurements and the error bars indicate standard

deviation. The horizontal line represents the threshold of 1 considered for discrimination between positive and negative. Statistical analysis was performed using Prism 5 Graph Pad, using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test; *** = $p < 0.0001$, $n = 3$.

TB diagnostics are achieved using *Gold on Paper* coupled to a mobile device and operational remote assessment is possible via RGB scrutiny.

After colour development three samples (paper microplate, MTBC positive and MTBC negative) were characterised via scanning electron microscopy (SEM) (Fig. 3). Results show a clear difference in the Au-nanoprobe dispersion in the presence of MTBC and non-MTBC target samples, the latter showing extensive Au-nanoprobe aggregation on the paper fibres. As shown above, these results show direct correlation with the colour captured in the digitalised images.

4 Conclusions

Serious efforts have been directed to provide robust, yet simple and portable molecular diagnostic platforms for use at peripheral laboratories and/or point-of-need. This is particularly relevant when assembling diagnostics platforms for worldwide epidemics with high numbers of affected people in less equipped regions of the globe, as in the case of tuberculosis. Here we show the potential of the *Gold on Paper* platform for TB molecular diagnostics that could be proven as a useful tool in the fight against TB. *Gold on Paper* is the working concept of integrating a paper microwell platform and a biomolecular detection scheme based on Au-nanoprobes. *Gold on Paper* was shown to be capable of efficiently detecting MTBC members directly and, by means of a smartphone device, analysing data on the spot while maintaining sensitivity and specificity. We have demonstrated that *Gold on Paper* detection is easy to perform without the need for expensive and complex laboratory set ups. Using *Gold on Paper*, it is possible to attain a positive identification of the pathogen within one hour, which via the use of a generic "smart" mobile device allows for complete analysis at a peripheral laboratory. We demonstrate that smartphones can be used as tools for data acquisition and handling in paper-based bioassays, eliminating the need to transmit data to get the results. Ultimately, we envisage a software package that collects and analyses the results on-site, and transmits the collected data to a centralised infrastructure. One issue hindering full implementation into remote locations may be the need for DNA sample preparation that now relies on PCR amplification, which is time consuming and costly. Nevertheless, efforts are being made to optimise this system via the removal of this limiting step. The limitation imposed by the DNA sample preparation is greatly overcome by the potential use of this methodology to identify and characterise the molecular signatures involved in antibiotic resistance.²² This way, the additional level of information will be of most value to implement and/or adjust therapy. The whole process, including the PCR amplification step, occurs under 2h30, which is considerably faster than traditional methods.

Before *Gold on Paper* can be translated into clinics and to the point-of-need, extensive validation is still required. Also, the PCR step ought to be removed and/or modified without loss of

View Online

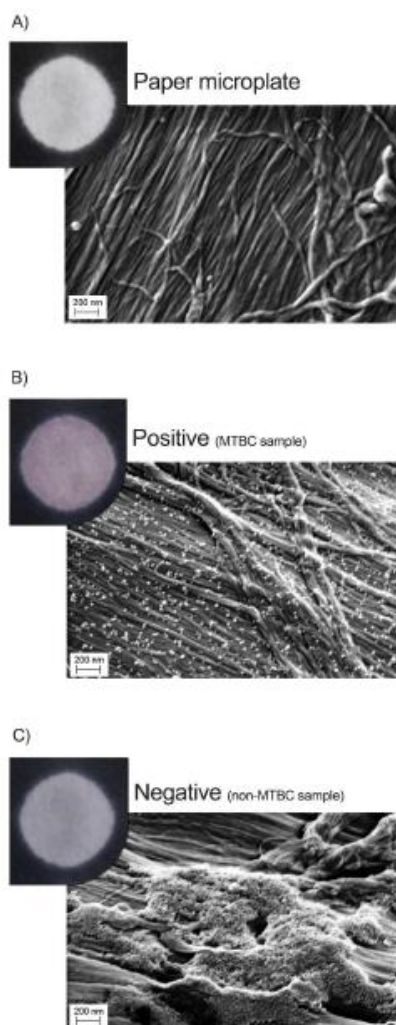


Fig. 3 *Gold on Paper* molecular diagnostics. Photographic captures of the detection on each well together with SEM images after the detection procedure. (A) Standard paper microplate well; (B) identification of a positive sample for *M. tuberculosis* complex (MTBC) showing the typical red colour on the spot. SEM image showing non-aggregated Au-nanoparticles; (C) Negative sample (non-MTBC DNA). SEM shows the extent of Au-nanoparticle aggregation on paper.

sensitivity, for example by including a paper microfluidics system for sample preparation.

Also, because we used paper as the platform for spotting and development of the aggregation assay, using SEM analysis it was possible to provide additional evidence of the differential aggregation events taking place in solution. For the first time,

irrefutable evidence of the mechanism underlying the target-mediated aggregation of Au-nanoparticles via the non-cross-linking approach mechanism has been provided. In fact, the presence of the specific target prevents against salt induced aggregation and, as result, the solution retains the original colour; conversely, aggregation of the Au-nanoparticles upon salt addition occurs because no target is present to hybridise to the nanoprobe and hamper aggregation.

Based on *Gold on Paper* it is possible to perform the biorecognition and detection event and transmit digital information over existing communication channels, combined with geolocation metadata inserted into the captured digital images. This integrated diagnostics scheme can then forward the attained data to a centralised off-site server allowing for monitoring of TB in real-time that could be proven to be extremely useful in remote areas of the globe lacking resources. Future studies will be carried out to optimise the methodology towards validation, direct application to clinical samples, and to extend the range of applications to mutations associated with drug resistance.

Acknowledgements

This work was partially supported by the European Commission under project INVISIBLE (FP7 ERC grant n° 228144), and FCT/MEC: Strategic Projects PEst-C/CTM/LA0025/2011 and PEst-OE/SAU/UI0009/2011; Projects PTDC/EEA-ELC/099490/2008 (paper@), PTDC/SAU-BEB/098125/2008 (BloodFET), PTDC/CTM/NAN/109877/2009, PTDC/CVT/111634/2009. B. Veigas was supported by FCT/MEC (SFRH/BD/78970/2011).

References

- 1 World Health Organization (WHO), *Global tuberculosis control surveillance, planning, financing*, WHO, Geneva, Switzerland, 2011, ISBN 978 92 4 156438 0.
- 2 M. Barnard, H. Albert, G. Coetzee, R. O'Brien and M. E. Bosman, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2008, **177**, 787–792.
- 3 H. De Beenhouwer, Z. Lhiang G. Jannes, W. Mijs, L. Machtelmecx, R. Rossau, H. Traore and F. Portaels, *Tubercle Lung Dis.*, 1995, **76**, 425–430.
- 4 M. Viveiros, M. Martins, I. Couto, L. Rodrigues, D. Machado, I. Portugal and L. Amaral, *Expert Rev. Anticancer Ther.*, 2010, **8**, 465–480.
- 5 D. Hillemann, M. Weizenegger, T. Kubica, E. Richter and S. Niemann, *J. Clin. Microbiol.*, 2005, **43**, 3699–3703.
- 6 W. G. Park, W. R. Bishai, R. E. Chaisson and S. E. Dorman, *J. Clin. Microbiol.*, 2002, **40**, 4750–4752.
- 7 S. Su, R. Nutiu, C. D. Filipe, Y. Li and R. Pelton, *Langmuir*, 2007, **23**, 1300–1302.
- 8 R. Tanaka, T. Yuh, N. Nagatani, T. Endo, K. Kerman, Y. Takamura and E. Tamiya, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **385**, 1414–1420.
- 9 A. Y. Kolosova, L. Sibanda, F. Dumoulin, J. Lewis, E. Duveiller, C. Van Peteghem and S. De Saeger, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **616**, 235–244.
- 10 D. A. Bruzewicz, M. Reches and G. M. Whitesides, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 3387–3392.
- 11 A. W. Martinez, S. T. Phillips, E. Carrilho, S. W. Thomas III, H. Sindi and G. M. Whitesides, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 3699–3707.
- 12 E. Carrilho, S. T. Phillips, S. J. Vella, A. W. Martinez and G. M. Whitesides, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 5990–5998.
- 13 E. Carrilho, A. W. Martinez and G. M. Whitesides, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 7091–7095.
- 14 Y. H. Ngo, D. Li, G. P. Simon and G. Garnier, *Langmuir*, 2012, **28**, 8783–8790.
- 15 W. Zhao, M. M. Ali, S. D. Aguirre, M. A. Brook and Y. Li, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 8431–8437.
- 16 H. M. E. Azzazy, M. M. H. Mansour and S. C. Kazmierczak, *Clin. Chem.*, 2006, **52**, 1238–1246.

[View Online](#)

- 17 M. Das, G. Sumana, R. Nagarajan and B. D. Malhotra, *Thin Solid Films*, 2010, **519**, 1196–1201.
- 18 K. K. Jain, *Clin. Chem.*, 2007, **53**, 2002–2009.
- 19 H. M. E. Azzazy and M. M. H. Mansour, *Clin. Chim. Acta*, 2009, **403**, 1–8.
- 20 P. V. Baptista, M. Koziol-Montewka, J. Paluch-Oles, G. Doria and R. Franco, *Clin. Chem.*, 2006, **52**, 1433–1434.
- 21 B. Veigas, G. Doria and P. V. Baptista, in *Nanodiagnosics for Tuberculosis, Understanding Tuberculosis-Global Experiences and Innovative Approaches to the Diagnosis*, ed. Dr Pere-Joan Cardona, InTech, 2012, ch. 12, pp. 257–276.
- 22 B. Veigas, D. Machado, J. Pendigão, I. Portugal, I. Couto, M. Viveiros and P. V. Baptista, *Nanotechnology*, 2010, **21**, 5101–5108.
- 23 G. Doria, J. Conde, B. Veigas, L. Giestas, C. Almeida, M. Assunção, J. Rosa and P. V. Baptista, *Sensors*, 2012, **12**, 1657–1687.
- 24 L. B. Silva, B. Veigas, G. Doria, P. Costa, J. Inácio, R. Martins, E. Fortunato and P. V. Baptista, *Biosens. Bioelectron.*, 2011, **26**, 2012–2017.
- 25 P. C. Soo, Y. T. Horng, K. C. Chang, J. Y. Wang, P. R. Hsueh, C. Y. Chuang, C. C. Lu and H. C. Lai, *Mol. Cell Probes*, 2009, **23**, 240–246.
- 26 P. C. Lee and D. Meisel, *J. Phys. Chem.*, 1982, **86**, 3391–3395.
- 27 J. J. Storhoff, R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin and R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 1959–64.
- 28 P. V. Baptista, G. Doria, D. Henriques, E. Pereira and R. Franco, *J. Biotechnol.*, 2005, **119**, 111–117.

Bruno Veigas^{a,b}, Jorge M. Jacob^b, Mafalda N. Costa^b, David S. Santos^b, Miguel Viveiros^c, João Inácio^d, Rodrigo Martins^b,
Pedro Barquinha^b, Elvira Fortunato^b and Pedro Viana Baptista^a

Bruno Veigas^{a,b}, Jorge M. Jacob^b, Mafalda N. Costa^b, David S. Santos^b, Miguel Viveiros^c, João Inácio^d, Rodrigo Martins^b.

Pedro Barquinha^b, Elvira Fortunato^b and Pedro Viana Baptista^a

* CIGMH, Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Campus de Caparica, 2829-516 Caparica, Portugal

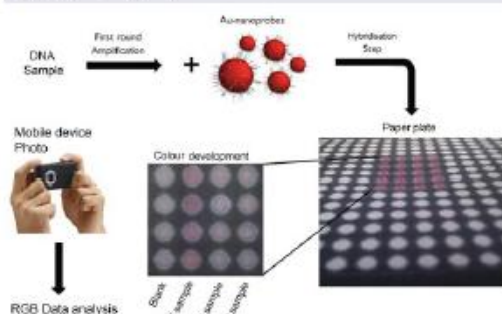
³ CENIMAT/3IN, Departamento de Ciência dos Materiais, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Campus da Caparica, 2620-518 Caparica, Portugal

[†] Grupo de Micobactérias, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Portugal

* Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, IP, Lisboa, Portugal

Tuberculosis (TB) remains one of the most serious infectious diseases in the world. According to the World Health Organisation, TB was responsible for 1.4 million deaths and 8.7 million new cases in 2011 alone¹. The development of cheap and simple methodologies capable of identifying TB causing agents belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* Complex (MTBC) is of paramount relevance for the timely and effective diagnosis and management of patients². We developed a colorimetric Au-nanoprobe assay integrated on a paper-platform that allows for colour development and a simple data analysis, capable of specific detection of MTBC members – we call it “Gold on Paper”. Upon integration of this Au-nanoprobe colorimetric assay onto the paper microplate, differential colour scrutiny may be captured and analysed with a generic “Smartphone” device. This strategy uses the mobile device to digitalise the intensity of the colour associated with each colorimetric assay, perform RGB analysis and transfer relevant information to an off-site lab, thus allowing for efficient diagnostics^{3,4}.

Au-Nanoprobe strategy for the detection of MTBC members. Schematic representation of the detection with Au-nanoprobes. The colorimetric assay consists of visual comparisons of test solutions after salt induced Au-nanoprobe aggregation on a ITO/CL1 impregnated paper plate.



MTBC Au-nanoprobe alone—Blank; MTBC Au-nanoprobe in the presence of MTBC sample—*M. tuberculosis*; MTBC Au-nanoprobe in the presence of a non-MTBC sample; and MTBC Au-nanoprobe in the presence of a non-complementary sample—non-related. After colour development a photo of the paper plate is captured and RGB image analysis is performed.

Figure 2 consists of three bar graphs labeled A, B, and C, each showing the effect of 100 mg/kg/day of 17β-E2 on different parameters in ovariectomized mice. The y-axis for all graphs is 'Days'.

- Panel A: Estrus duration (days)**
 - Groups: Sham (black bar), 17β-E2 (red bar), Vehicle (blue bar), and 17β-E2 + Vehicle (grey bar).
 - Approximate values: Sham (~1.5), 17β-E2 (~3.5), Vehicle (~1.5), 17β-E2 + Vehicle (~1.5).
 - Significance: *** (P < 0.001) for the 17β-E2 group compared to Sham.
- Panel B: Estrus intensity (days)**
 - Groups: Sham (black bar), 17β-E2 (red bar), Vehicle (blue bar), and 17β-E2 + Vehicle (grey bar).
 - Approximate values: Sham (~1.5), 17β-E2 (~3.5), Vehicle (~1.5), 17β-E2 + Vehicle (~1.5).
 - Significance: *** (P < 0.001) for the 17β-E2 group compared to Sham.
- Panel C: Estrus-related behaviors (days)**
 - Groups: Sham (black bar), 17β-E2 (red bar), Vehicle (blue bar), and 17β-E2 + Vehicle (grey bar).
 - Approximate values: Sham (~1.5), 17β-E2 (~3.5), Vehicle (~1.5), 17β-E2 + Vehicle (~1.5).
 - Significance: *** (P < 0.001) for the 17β-E2 group compared to Sham.

(A) WTCC standard assay performed in a microplate reader. Nanoparticle aggregation as measured by the ratio of absorbance at 690 nm of GPC reagent and G20 (800 nm) for the assay mixtures—2.5 nM microparticles, 10 nM phosphate buffer pH 6.0, 0.1 M NaCl, and specific PNC amplified DNA at a final concentration of 30 ng mL⁻¹ in a total volume of 30 µL. Inset shows PNC incubated with [MgCl₂] = 0.02 M. (B) WTCC assay performed in the same plate reader. Nanoparticle aggregation as measured by light DDM analysis. Ratio of aggregation calculated in ImageJ™ as PC for the assay mixtures. (C) WTCC assay performed in the plate reader. The same assay mixtures as in (A) were used. The inset shows the same assay mixtures as in (A). The bars represent the average of three independent measurements and the error bars indicate standard deviation. The horizontal line represents the threshold of 1 considered for discrimination between positive and negative results. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001, *****P < 0.00001.

Gold on Paper was shown to be capable of efficiently detecting MTBC members directly and, by means of a smartphone device, analysing data on the spot while maintaining sensitivity and specificity.

We demonstrate that smartphones can be used as tools for data acquisition and handling in paper-based bioassays, eliminating the need to transmit data to get the results.

This integrated diagnostics scheme can then forward the geolocation metadata, inserted into the captured digital images, to a centralised off-site server allowing for monitoring of TB in real-time.

Future studies will be centred out to optimise the methodology towards validation, direct application to clinical samples, and to extend the range of applications to mutations associated with drug resistance.

References

[Downloaded from ascelibrary.org by Columbia University on 07/26/14](#)

2. Mc Donald, H. Abart, B. Conway, R. O'Brien and M. E. Beaman, *Ann J Respir Crit Care Med*, 2005, 172, 767-772.

2A. H. MATHIE, S. T. PIRIE, S. CANNON, S. W. 2nd THOMAS, H. SCHWAB & D. H. WRENNING, *Angew. Chem.*, 2008, 120, 3039-3737.

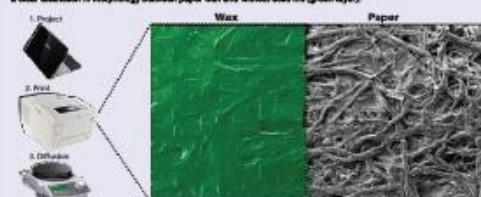
8.P. K. Bapat, M. Kozul-Montevila, J. Piquero-Chis, G. Doria and R. Franco, *Org. Chem.*, 2008, **83**, 14215-14224.

© 1997 by Blackwell Publishers Ltd. *Journal of Internal Medicine* 241: 395–402

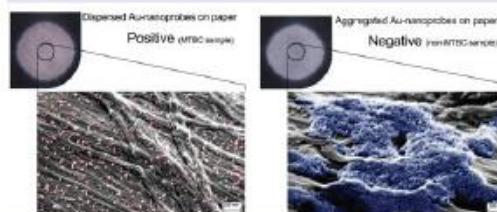
Paper platform was produced with a commercially available wax-printing technology

Paper platform was produced with a commercially available wax-printing technology

After the printing process the paper is heated up on a hot plate, allowing the wax to move vertically through the porous paper, creating hydrophobic barriers that define reaction zones. SEM images of the Whatman no. 1 paper surface show a clear distinction in morphology between paper with and without solid ink (green layer).



Gold on Paper molecular diagnostics. Photographic captures of the detection on each well together with coloured SEM images after the detection procedure.



Left) Identification of a positive sample for *M. tuberculosis* Complex (MTBC) showing the typical red colour on the apt. SEM image showing apt-aggregated Au-nanoprobe (Red); Right) Negative sample (non-MTBC DNA). SEM shows the extent of Au-nanoprobe aggregation on paper (Blue).

EDS analysis. Aggregated Au-nanoprobes sample (Negative) was further analysed by scanning electron microscopy (SEM)-energy dispersive X-ray spectrometry (EDS).



Left) SEM image shows the presence of aggregates on paper; Right) EDS map, shows the distribution of Gold in the sample. EDS mapping further characterises and confirms the presence of Gold in the aggregated structures shown by the SEM image.



Get the PDF

